

POLYBRENE^R -

EIN NEUES AGGLUTINATIONSFÖRDERNDES VERSTÄRKERMEDIUM
AUF DER GRUNDLAGE EINER AGGREGATIONSVERMITTLUNG

Klaus Alraun

Disbui. München

1987



Aus der III. Medizinischen Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Wilmans

POLYBRENE^R-

EIN NEUES AGGLUTINATIONSFÖRDERNDES VERSTÄRKERMEDIUM
AUF DER GRUNDLAGE EINER AGGREGATIONSVERMITTLUNG

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Alraun
aus
München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof Dr. W. Mempel

Mitberichterstatter:

1. Prof. Dr. W. Wilmanns
2. Prof. Dr. E. Liebhardt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. M. Heim

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1987

Meinen Eltern

1.	Einleitung	1
2.	Die Eltern	2
3.	Die Kindheit	3
4.	Die Jugend	4
5.	Die Ehe	5
6.	Die Kinder	6
7.	Die Eltern	7
8.	Die Kindheit	8
9.	Die Jugend	9
10.	Die Ehe	10
11.	Die Kinder	11
12.	Die Eltern	12
13.	Die Kindheit	13
14.	Die Jugend	14
15.	Die Ehe	15
16.	Die Kinder	16
17.	Die Eltern	17
18.	Die Kindheit	18
19.	Die Jugend	19
20.	Die Ehe	20
21.	Die Kinder	21
22.	Die Eltern	22
23.	Die Kindheit	23
24.	Die Jugend	24
25.	Die Ehe	25
26.	Die Kinder	26
27.	Die Eltern	27
28.	Die Kindheit	28
29.	Die Jugend	29
30.	Die Ehe	30
31.	Die Kinder	31
32.	Die Eltern	32
33.	Die Kindheit	33
34.	Die Jugend	34
35.	Die Ehe	35
36.	Die Kinder	36
37.	Die Eltern	37
38.	Die Kindheit	38
39.	Die Jugend	39
40.	Die Ehe	40
41.	Die Kinder	41
42.	Die Eltern	42
43.	Die Kindheit	43
44.	Die Jugend	44
45.	Die Ehe	45
46.	Die Kinder	46
47.	Die Eltern	47
48.	Die Kindheit	48
49.	Die Jugend	49
50.	Die Ehe	50
51.	Die Kinder	51
52.	Die Eltern	52
53.	Die Kindheit	53
54.	Die Jugend	54
55.	Die Ehe	55
56.	Die Kinder	56
57.	Die Eltern	57
58.	Die Kindheit	58
59.	Die Jugend	59
60.	Die Ehe	60
61.	Die Kinder	61
62.	Die Eltern	62
63.	Die Kindheit	63
64.	Die Jugend	64
65.	Die Ehe	65
66.	Die Kinder	66
67.	Die Eltern	67
68.	Die Kindheit	68
69.	Die Jugend	69
70.	Die Ehe	70
71.	Die Kinder	71
72.	Die Eltern	72
73.	Die Kindheit	73
74.	Die Jugend	74
75.	Die Ehe	75
76.	Die Kinder	76
77.	Die Eltern	77
78.	Die Kindheit	78
79.	Die Jugend	79
80.	Die Ehe	80
81.	Die Kinder	81
82.	Die Eltern	82
83.	Die Kindheit	83
84.	Die Jugend	84
85.	Die Ehe	85
86.	Die Kinder	86
87.	Die Eltern	87
88.	Die Kindheit	88
89.	Die Jugend	89
90.	Die Ehe	90
91.	Die Kinder	91
92.	Die Eltern	92
93.	Die Kindheit	93
94.	Die Jugend	94
95.	Die Ehe	95
96.	Die Kinder	96
97.	Die Eltern	97
98.	Die Kindheit	98
99.	Die Jugend	99
100.	Die Ehe	100

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor
Dr. med. W. Mempel für die Überlassung des
Themas und die gute Zusammenarbeit mit den
Mitarbeitern des Transfusionszentrums.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. med. M.
Heim, der mir jederzeit helfend zur Seite
stand.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	E I N F Ü H R U N G	1
1.1	Geschichtlicher Überblick	1
1.2	Defizite im Antikörpernachweis	3
1.3	Blutgruppen und korrespondierende Antikörper	5
1.3.1	Klinisch wichtige Blutgruppensysteme	6
1.3.2	Aufbau und Verteilung der Blutgruppenantigene	9
1.4	Eigenschaften erythrozytärer Antikörper	10
1.4.1	Grundstruktur und biologische Daten	11
1.4.2	Serologisches Verhalten	13
1.5	Ag-Ak-Reaktion und Agglutination	13
1.6	Grundlagen und Methoden des Ak-Nachweises	16
1.6.1	Grundlagen	17
1.6.2	Methoden des Antikörpernachweises	19
1.6.2.1	Der Albumintest	19
1.6.2.2	Der LISS-Test	21
1.6.2.3	Der Enzymtest	22
1.6.2.4	Der Antihumanglobulintest	24
1.6.3	Der Mehrstufentest	26
1.7	Ein neuer Agglutinationsverstärker	26
1.8	Problemstellung	28
2.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N	29
2.1	Patientenproben	29
2.2	Untersuchungsmethoden	29
2.3	Ablauf der Untersuchung	30
2.3.1	Die Verdünnungsreihe	30
2.3.2	Die Testerythrozyten	31
2.3.3	Zentrifugieren und Ablesen	32
2.3.4	Medienzugabe und Inkubationszeiten	32
2.3.5	Der abschließende AHG-Test	35
2.4	Testkontrollen	36
2.5	Bewertung der Agglutinationsstärke	36

3.	E R G E B N I S S E	38
3.1	Sensitivitätsvergleich	38
3.2	Nachweisstärke der Polybrene-Technik(20°C) im Vergleich zu LISS(AHG), Enzym(37°C) und Albumin(AHG)	40
3.2.1	Punktsummenmittelwerte des untersuchten Ak-Spektrums	40
3.2.2	Entfernung der Polybrene-Scores vom Mittel aller Medien bei Anti-D, -K, -Fy ^a und -Le ^a	41
3.3	Einfluß von Probenherkunft und Testzellwahl auf die Agglutinationsstärke	44
3.3.1	Vergleich von Serum- und Plasma-Antikörperprobe ..	44
3.3.2	Vergleich von homo- und heterozygoten Testzellen ..	47
3.4	Agglutinationsstärke bei LISS- und ALBUMIN-Medien verschiedener Hersteller	50
3.4.1	Vergleich der Summscores von vier LISS-Reagenzien	50
3.4.2	Vergleich der Summscores von vier ALBUMIN-Lösungen	50
3.5	Die untersuchten Ak-Spezifitäten im Überblick ..	52
3.5.1	Der POLYBRENE-Test bei verschiedenen Ak-Gruppen ..	52
3.5.2	Tabellarische Übersicht: die Punktsummscores aller angesetzten Verdünnungsreihen im Drei-Stufen-Test. .	54
3.6	Statistische Tests	57
4.	D I S K U S S I O N	58
4.1	Der neue Aggregationsvermittler POLYBRENE	58
4.1.1	Die Zuverlässigkeit	58
4.1.2	Zeitvorteil	59
4.1.3	Einschränkungen der Validität	59
4.2	Einfluß von Serum- bzw. Plasmalösung der Ak auf das Verhalten im Drei-Stufen-Test	60
4.3	Einfluß der Gendosis der Indikatorzellen	61
4.4	Wirkungsvergleich von LISS- und ALBUMIN-Reagenzien	61
4.5	Notwendige Vielfalt der Verstärkermethoden	62
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	64
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	65
7.	L E B E N S L A U F	69

1. Einführung

1.1 Geschichtlicher Überblick

Mit der Entdeckung des Blutkreislaufs durch William Harvey im Jahre 1628 setzten zum ersten Male Versuche ein, über In- und Transfusionen Einfluß auf die Zusammensetzung der im Sinne der Humoralpathologie krankheitsbestimmenden Körpersäfte zu nehmen (11).

So spritzte man Jagdhunden zur Heilung Wein, probierte mittels Röhren eine Transfusion zwischen Tieren, und einem gewissen Jean-Baptiste Denis soll sogar die erste erfolgreiche Blutübertragung auf den Menschen gelungen sein: 1667 verabreichte er jemandem 1,41 Liter Schafsblut ohne üble Folgen.

Sein späterer Versuch, einem jungen Mann zur Besänftigung seiner Natur Kalbsblut zu übertragen, führte indes zum Tod des Empfängers, worauf weitere Transfusionen verboten wurden (11).

Die Idee der Bluttransfusion regte jedoch zahlreiche Forscher zu Untersuchungen über physiologische und chemische Fragen der Blutzirkulation an: experimentelle Studien zeigten, daß ausgeblutete Tiere durch Retransfusion wiederbelebt werden konnten, daß das Blut Sauerstoff mit sich führt und daß das Blut auf Tiere übertragen werden kann, wenn es vorher durch Ausquirlen ungerinnbar gemacht worden war.

Doch erst mit der Entdeckung der menschlichen ABO-Blutgruppen durch Karl Landsteiner konnte das Problem der Transfusionsreaktionen näher erklärt werden (28).

Er identifizierte als menschliche Hauptblutgruppen im Jahre 1901 zunächst die Gruppen A, B und C (heute als O bekannt), später kam AB als vierte Hauptblutgruppe hinzu. Außerdem konnte er die von ihm aufgestellte Regel bestätigen, nach der sich im menschlichen

Serum stets die zur jeweils vorhandenen Erythrozyteneigenschaft kompatiblen Isoagglutinine Anti-B od./u. Anti-A finden.

In der medizinischen Praxis erwies sich Landsteiners Entdeckung als ein wichtiger Meilenstein.

1908 testete OTTENBERG erstmals vor einer Transfusion das Blut von Spender und Empfänger auf Verträglichkeit (45).

Solange Kompatibilitätstests nicht vorgenommen worden waren, hatten sich Unverträglichkeiten oft nur deshalb nicht eingestellt, weil aufgrund der statistischen Häufigkeitsverteilung der Blutgruppen bei zwei Dritteln aller Übertragungsfälle ohnehin keine ABO-Unverträglichkeit auftritt.

Mit der Möglichkeit der Blutkonservierung durch Zusatz von Na-Citrat, die HUSTIN, AGOTE und LEWISSON voneinander unabhängig im Jahre 1914 entdeckt hatten, fand die indirekte Bluttransfusion weite Verbreitung (45).

Mit der Einbeziehung der Bluttransfusion in den medizinischen Alltag wurde eine Therapieidee verwirklicht, die seit William Harveys Entdeckung drei Jahrhunderte wechselvoller Fortentwicklung hinter sich hatte.

Ein eigenes Fach Blutgruppenserologie beschäftigt sich heute im Rahmen der Immunhämatologie mit den immunologischen Eigenschaften verschiedener Blutbestandteile und ihrer korrespondierenden Antikörper.

Zentrales Erkennungsprinzip der serologischen Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) und anderer Nachweisverfahren einer Antigen-Antikörper-Reaktion ist die A g g l u t i n a t i o n .

Mit Agglutinationstests konnten die Risiken der immer häufiger eingesetzten Bluttransfusion (7) gemindert werden, indem einerseits die Techniken der Kreuzprobe selbst verbessert (Supplementlösungen, zusätzliche Coombsphase etc.), andererseits durch Antikörpersuchtests ergänzt wurden (43).

Die bei allen Methoden beschriebenen Nachweisausfälle zeigen die Schwierigkeit, eine standardisierte Kombination verschiedener Nachweismethoden zu finden, die einen 100%igen Nachweis der vorhandenen Ak gewährleistet.

1.2 Beispiele und Folgen von Defiziten im Antikörpernachweis

Auch ständige Weiterentwicklungen bei den verschiedenen Testtechniken konnten Nachweismängel oder -ausfälle klinisch wichtiger Ak nicht ausschließen, wie man den zahlreichen Berichten über unvorhersehbare Versager sonst zuverlässig angewandter Nachweismethoden entnehmen kann (4, 8, 13, 14, 31, 32, 34, 36, 44).

Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlich ausgeprägten hämolytischen Potenz der Ak innerhalb desselben Blutgruppensystems wider.

Nachfolgend werden Ak beschrieben, die, obwohl überwiegend als klinisch ungefährlich bekannt, in Einzelfällen zu Transfusionsreaktionen führten.

So konnten BHARUCHA et al. im mütterlichen Serum einen stark komplementbindenden IgG-Antikörper der Spezifität Anti-Le^b neben dem sonst üblichen komplementbindenden Anti-Le^b mit IgM-Struktur nachweisen, der als IgG die Plazentabarriere überwinden konnte und beim Kind eine mild verlaufende hämolytische Anämie auslöste (4).

Ungewöhnliche und seltene Variationen im serologischen Verhalten wurden auch von Antikörpern der Spezifität Anti-M berichtet.

In der ersten Arbeit löst ein als kompletter Kälteantikörper (IgM) bekanntes Anti-M einen Morbus hämolyticus neonatorum aus. Weder der direkte noch der indirekte Coombstest ergab einen positiven Nachweis; dagegen waren sowohl im salinen Milieu bei 4°C und 20°C wie auch unter Albuminzusatz bei 37°C je nach Gendosis

der verwendeten Testerythrozyten deutliche Agglutinationsreaktionen zu verzeichnen.

Wieder lag neben einem typischen kompletten Anti-M ein inkompletter Immun-Antikörper der gleichen Spezifität vor, von dem in vivo die kindlichen Erythrozyten sensibilisiert wurden (13).

Im zweiten Artikel schildern FURLONG et al. drei Fälle einer verzögerten Transfusionsreaktion durch Anti-M-Antikörper, die 5 bis 15 Tage nach der unauffälligen Kreuzprobe und anschließender Transfusion Symptome einer milden hämolytischen Episode auslösten.

Durch die Übertragung M-positiver Erythrozyten war es zu einer Stimulation des Immunsystems (Boosterung) gekommen, so daß sich nun im direkten wie indirekten Coombstest sowie nach Absprengung der Antikörper von den Patientenerythrozyten im Eluat Anti-M nachweisen ließ.

Um die Risiken beim Ak-Nachweis zu senken, empfehlen die Autoren die Anwendung der sensibleren LISS-Technik, die wegen ihrer verkürzten Inkubationszeit bei dringlicher Transfusionsvorbereitung praktische Vorteile bietet und im Erfahrungsbereich der Autoren die Rate verzögerter Transfusionsreaktionen auf ein Drittel des früheren Dreijahreswertes sinken ließ (14).

Auch MOORE et al. sehen aufgrund der Ergebnisse einer dreijährigen Studie in s e n s i t i v e r e n Nachweismethoden ein Mittel, bisher verdeckte Transfusionsreaktionen des meist mild verlaufenden, 'verzögerten' Typs nach Häufigkeit, Verlauf und beteiligten Antikörperspezifitäten zu untersuchen und mit verbesserten Routinetests vor einer Transfusion weitgehend zu verhindern. Dabei weisen sie insbesondere auf die zentrale Rolle hin, die Anti-E- und Anti-Jk^a-Antikörper bei 'verzögerten' Transfusionsreaktionen spielen (34).

Die Schwierigkeit des Anti-Jk-Nachweises machte diese Antikörper-spezifität wiederholt zum Prüfstein für die Güte verschiedener Testreagenzien, wobei das im Dreistufentest verwendete Coombs-reagenz und seine antikomplementäre Aktivität im Vordergrund der Diskussionen stand. Schließlich erwiesen sich bei Untersuchungen von HOWARD et al., daß etwa 23 Prozent aller entdeckten Kidd-Antikörper nur mit Anti-C3-Antikörpern (d.h. nur über die Komplementaktivierung) nachweisbar waren (20).

Vergleichsuntersuchungen, die neun bzw. zehn kommerzielle Reagenzien umfaßten, sowie Berichte über Nachweisversagen aufgrund unzulänglicher antikomplementärer Wirksamkeit der angebotenen Antiglobulinreagenzien mündeten in die Forderung, die Antikomplementfaktoren in den Coombsreagenzien zu potenzieren und verbindliche Standards für ihre Wirksamkeit zu finden (15, 22, 44).

Schon aus diesen wenigen Beiträgen, die die kritischen Punkte jeder routinemäßigen Antikörpersuche beleuchten - unerwartete Antikörpervariation, Gendosis der Testerythrozyten, standardisierte Tests mit verlässlicher Sensitivität - geht die Dringlichkeit methodischer Vergleichsuntersuchungen hervor.

1.3 Blutgruppen und korrespondierende Antikörper

Mit der Entdeckung des ABO-Blutgruppensystems wurde erstmals das praktische Haupthindernis für risikoärmere Bluttransfusionen erkannt.

Die Hypothese, daß diese zellständigen Blutfaktoren genetisch determinierte, erbliche Eigenschaften seien, stellten EPSTEIN und OTTENBERG im Jahre 1908 auf; bald darauf wurde sie von DUNGERN/HIRSZFELD bestätigt (45).

Daß Blutgruppen als genetisch determinierte Bluteigenschaften konstant vorhanden und durch Alter und Umwelteinflüsse nicht be-

einflußbar sind, überdies leicht bestimmt und in ihrem Erbgang verfolgt werden können, verlieh ihnen bald eine zentrale Stellung bei forensischen und verwandtschaftlichen Gutachten.

In den entdeckten Blutgruppensystemen zeigte sich schon früh das Phänomen des genetischen Polymorphismus, wie es später auch an anderen zellulären Elementen des Blutes, Enzymen ihres Zellplasmas oder bei Serumenzymen nachgewiesen werden konnte. Allein von der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase gibt es beim Menschen 100 verschiedene allele Varianten (24).

Mittlerweile kennt man den Genort der drei allelen Gene des ABO-Systems - das Chromosom Nr. 9 - sowie die Genorte anderer wichtiger erythrozytärer Blutgruppensysteme.

1.3.1 Klinisch wichtige Blutgruppensysteme

Das genetisch polymorphe System von Membraneigenschaften menschlicher Erythrozyten umfaßt nach heutigem Kenntnisstand an die 400 Merkmale, d.h. spezifische Polysaccharid-Aminosäure-Komplexe mit Antigencharakter, die nach ihrer typischen serologischen Reaktion auch Agglutino gene genannt werden.

Jeder Mensch trägt auf seinen Erythrozyten eine bestimmte Kombination dieser Antigene, wobei die meisten in ihrer immunogenen Potenz so schwach sind, daß sie bei Bluttransfusionen kaum eine Rolle spielen.

Erythrozytäre Blutgruppensubstanzen sind beim Menschen bereits in der Fetalperiode nachweisbar und erscheinen etwa im 4. Lebensjahr quantitativ und qualitativ voll ausgeprägt.

Nebenbei sei erwähnt, daß Blutgruppensubstanzen und ihre Antikörper auch bei Tieren, Pflanzen(Lektine), Bakterien und Viren weit verbreitet sind.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die neun wichtigsten erythrozytären Blutgruppensysteme, korrespondierende Antikörper und deren Beteiligung an immunogenen Komplikationen.

Tab.1: Blutgruppensysteme und kritische Antikörper

Blut- gruppen- system	Antikörper	Hämolytische Transfusions- reaktion	Morbus hämolyticus neonatorum
ABO	Anti-A	ja	ja
	Anti-B	ja	selten
	Anti-A ₁	sehr selten	nein
	Anti-H	nein	nein
RHESUS	Anti-C	ja	selten
	Anti- $\bar{C}$	ja	ja
	Anti-C ^w	ja	selten
	Anti-D	ja	ja
	Anti-E	ja	ja
	Anti- $\bar{e}$	selten	sehr selten
KELL	Anti-K	ja	ja
DUFFY	Anti-Fy ^a	ja	sehr selten
KIDD	Anti-Jk ^a	ja	selten
LEWIS	Anti-Le ^a	ja	nein
MNSS $\bar{S}$	Anti-M, -N, -S, - $\bar{S}$	sehr selten	sehr selten
P	Anti-P ₁	sehr selten	sehr selten
LUTHERAN	Anti-Lu ^b	ja	sehr selten

Nach SCHMIDT R. F., THEWS G. (42) und BEGEMANN H. (3)

Die Bildung von Antikörpern gegen das ABO-System - der I s o - a g g l u t i n i n e (Anti-A, -B) - setzt im Laufe des ersten Lebensjahres ein und wird durch bakterielle Antigene, die als



Strukturanaloga von ABH-Substanzen über den Darm aufgenommen wurden, oder durch darmfloramodifizierte Nahrungsbestandteile ausgelöst (42).

Bei den übrigen Blutgruppensystemen löst erst die Begegnung von Fremderythrozyten mit immunkompetenten Zellen des eigenen Immunsystems die Bildung sogenannter *i r r e g u l ä r e r* Antikörper aus.

Die Agglutinationsfähigkeit der Erythrozyten und der Agglutinititer im Serum schwankt von Mensch zu Mensch beträchtlich und ist *in vivo* wie *in vitro* einer Vielzahl von Einflußgrößen ausgesetzt.

Das biochemische Äquivalent der Blutgruppen ist in hochmolekularen Strukturen verschiedener Niveauezonen der Erythrozytenoberfläche - meist Polysaccharid-Aminosäure-Komplexen - zu suchen, wobei die Polysaccharid-Komponente im allgemeinen die Spezifität und die Aminosäure-Komponente die antigene Wirksamkeit bestimmt (5).

Die spezifischen Zuckerreste, die je nach Blutgruppengen und von ihm kontrolliertem Enzym, z. B. Glykosyltransferasetyp A, als determinante Gruppen an ein Glykolipoid-Grundgerüst angelagert werden, stellen die *R e z e p t o r e n* für die korrespondierenden Antikörper dar.

Sie verteilen sich in charakteristischer Menge und Lokalisation über Höhen und Tiefen der Erythrozytenoberfläche, sind mehr oder weniger zugänglich und an der elektrostatischen Membranladung gegenüber der Umgebung beteiligt.

Daraus ergibt sich die von Blutgruppensystem zu -system unterschiedliche Agglutinationsstärke bei einer bestimmten Nachweismethode und die Vielfalt der bereits entwickelten Verfahren, einen optimalen Kompromiß zwischen noch erreichbarer Sensitivität für schwach agglutinierende und verlässlicher Spezifität bei stark reagierenden Blutgruppen von klinischer Relevanz zu finden.

Das gilt vor allem für Techniken, die von dem Prinzip ausgehen, die Oberfläche von Erythrozyten so zu verändern, daß die Bindungsstellen der Antikörper-Moleküle unter weniger sterischer Behinderung an die Rezeptoren der Relieftäler oder in maskierenden Nachbargruppierungen gelangen können.

Bei Blutgruppen mit exponierteren oder labileren Rezeptorarten führt diese sensitivere Technik zu einer verminderten Agglutination (35).

Der Erfolg einer Nachweismethode hängt damit auch von der molekularen Architektur und chemischen Konstitution der Rezeptoren ab.

1.3.2 Aufbau und Verteilung der Blutgruppenantigene

Proteine, Lipide, Glykolipide und Glykoproteine sind die Stoffklassen, die Komponenten für die blutgruppenspezifischen Oberflächenstrukturen zellulärer Elemente mit Antigen- oder für niedermolekulare, wasserlösliche Verbindungen in Plasma und Sekreten mit Haptencharakter liefern.

Erstere sind als membranständige Polysaccharid-Aminosäure-Komplexe unterschiedlich immunogen, lassen sich nach der chemischen Struktur ihrer Oligosaccharidkomponente in fünf Hauptgruppen unterteilen und erweisen sich sämtlich als kohlenhydratreiche Rezeptoren hoher immunologischer Spezifität.

Im ABO-System findet sich ein gut erforschtes Beispiel für den Aufbau des rezeptorbildenden Oligosaccharidteils von Glykoproteinen der Erythrozytenmembran und ihrer genetischen Kontrolle:

Vom ABO-Genlocus abhängige Glykosyltransferasen Typ A bzw. Typ B addieren die determinante antigene Struktur O-glykosidisch an einen allen ABO-Blutgruppen gemeinsamen Precursor. Liegt das O-Gen homozygot vor, werden von anderen Enzymen lediglich unspezifische Gruppen angelagert, die als H-Antigen auch bei allen anderen Blutgruppen vorkommen können (24).

Antigene Determinante für A: N-Acetyl-D-Galaktosamin
B: D-Galaktose

Neben der chemischen Konstitution der Rezeptoren stellt auch die Anzahl und typische Lokalisation auf der Erythrozytenoberfläche ein Charakteristikum jeder Blutgruppe dar.

Für das ABO-Blutgruppensystem schätzt man 0,8 bis 7 Millionen antigene Determinanten pro Zelle, je nach Mosaik zwischen 10 000 und 30 000 Rezeptoren im RHESUS-System, ca. 3000 bis 8000 Rezeptoren im KELL- und ca. 1000 bis 3000 Rezeptoren im DUFFY-Blutgruppensystem (35).

ABO-Rezeptoren finden sich ebenso oft in den Tälern wie auf den Erhebungen des Membranreliefs; MN-Antigene dagegen bevorzugen Höhenlagen, während sich RHESUS-, KELL-, DUFFY- und KIDD-Faktoren überwiegend in den Senken finden.

Bei einigen Blutgruppen entscheidet der paarweise Abstand von rezeptoradsorbierten Ig-G-Antikörpern über die sterischen Vorraussetzungen für eine Anlagerung der C1-Komponente des Komplementsystems als Auftakt eines hämolytischen Prozesses oder einer komplementaktivierenden Agglutination (24).

Die Rezeptorverteilung auf der Zellmembran hat also für die Agglutinationsstärke in vitro ebenso Bedeutung wie die Geometrie der agglutinierenden bi- oder multivalenten Antikörpermoleküle.

Auch bei In-Vivo-Vorgängen wie der Immunogenität von Blutgruppenantigenen spielt die Rezeptordichte eine Rolle. Bei ABO/RHESUS verhalten sie sich z. B. wie 50:1.

1.4 Eigenschaften erythrozytärer Antikörper

Erythrozytäre Antikörper sind gegen blutgruppenspezifische Antigene der Erythrozytenoberfläche gerichtet, werden nach Immunogenkontakt unter Kooperation mit Makrophagen, T- und B-Lymphozyten von Plasmazellen synthetisiert und in die Körperflüssigkeiten ausgeschieden.

Sie stellen eine sehr heterogene Gruppe von Glykoproteinen dar; nicht nur, daß sie verschiedenen Immunglobulinklassen angehören

und sich mit unterschiedlicher Affinität und Avidität an das Antigen binden, auch nach ihrer biologischen Funktion, den Ansprüchen an die Art und Zusammensetzung eines geeigneten Nachweissystems oder dem Temperaturoptimum ihrer Wirkung lassen sie sich differenzieren.

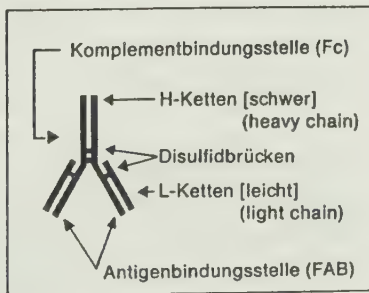
Dabei bestehen deutliche Zusammenhänge zwischen Antikörperstruktur und Funktion sowie zwischen Struktur und Temperatur und anderen biologischen Charakteristika, aber auch - je nach Konzentration und physikochemischen Milieubedingungen - fließende Übergänge z. B. zwischen den agglutinierenden und hämolysierenden Fähigkeiten der Antikörper (18).

1.4.1 Grundstruktur und biologische Daten

Immunglobuline sind Syntheseprodukte der aus den B-Lymphozyten hervorgegangenen Plasmazellen und wandern als P l a s m a p r o t e i n e elektrophoretisch in der -Globulin-Fraktion.

Wie andere Proteine auch, besitzen sie Disulfidbrücken zur Stabilisierung der unterschiedlich großen Untereinheiten gemeinsamen genetischen Ursprungs, die aber im Gegensatz zu allen anderen bekannten Proteinen symmetrisch angeordnet sind. Die oligomeren IgM und IgA weisen zusätzlich ein (IgM) bzw. zwei Verknüpfungspeptide (IgA) auf (24).

Die monomere Grundstruktur vereint bilateralsymmetrisch je zwei Polypeptide unterschiedlicher Kettenlänge (die L-Kette zeigt 214, die H-Kette 440 Aminosäuren mit einem Kohlenhydratanteil) über kovalente Bindungen (S-S) zu einer Y-förmigen Struktur, die für die notwendige Flexibilität bei der Antigenbindung sorgt.



Fc(MG 60 000) und Fab(MG 50 000) sind Spaltprodukte einer charakteristischen Proteolyse mit Enzymen wie zum Beispiel dem Papain: Fragment crystalline umfaßt die Carboxy-terminale Hälfte beider H-Ketten mit konstanter Aminosäuresequenz innerhalb eines Ketentyps und ist für die Komplementbindung, den diaplazentaren Übertritt von IgG sowie für die Gewebefähigkeit verantwortlich; die zwei identischen Fragment antibody-Fragmente enthalten aminoterminal bis zum 107. Aminosäurerest sowohl der H- als auch der L-Kette eine Region hypervariabler Aminosäuresequenz, die das morphologische Äquivalent der jeweiligen Antikörperspezifität darstellt.

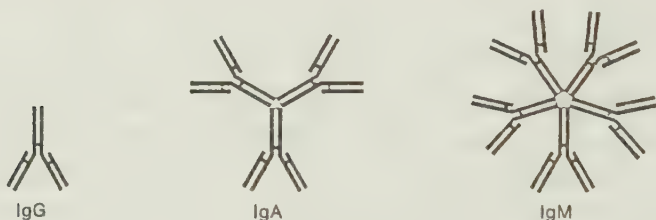


Abb.1: Strukturschema der Hauptimmunglobuline

Tab.2: Eigenschaften der Hauptimmunglobuline

	IgG	IgA	IgM
Molekulargewicht	150 000	150-800 000	900 000
Vorkommend als	Monomer	Oligomere	Pentamer
Plazentapassage	ja	nein	nein
Halbwertszeit	22-26 d	5-8 d	5-8 d
Synthesebeginn	16. Woche	4. Wo.	1. Wo
Serumkonz. (mg/ml)	6,0-16,0	1,5-5,0	0,5-2,0
Komplementfixation	ja	nein	ja

1.4.2 Serologisches Verhalten

Wegen der heterogenen Bildung erythrozytärer Antikörper in verschiedenen B-Zelllinien variiert auch die molekulare Architektur und serologische Reaktionsweise bei ein und derselben Antikörperspezifität.

Die Tabelle 3 auf der folgenden Seite zeigt globale Zusammenhänge zwischen der Spezifität, der sichersten Nachweismethode bzw. serologischer Kategorie von Antikörpern der wichtigsten Blutgruppensysteme und ihrer Struktur und Entstehung.

1.5 Antigen-Antikörper-Reaktion und Agglutination

Die spezifische Vereinigung von Antigen und Antikörper zu einem Antigen-Antikörper-Komplex erfüllt eine doppelte Aufgabe: Ein körperfremdes Antigen wird von hochspezifischen Bindungsstellen der Antikörper selektiv erkannt und durch die biologische Aktivität der Fc-Anteile beschleunigt eliminiert.

Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper ist reversibel; je größer die strukturelle Ähnlichkeit ist, um so stärker ist die Bindungsfähigkeit. Danach gibt es unter verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlicher Avidität einen optimal passenden, der andere vom Rezeptor verdrängen kann.

Aber auch nach der Antikörperadsorption können alternative Wege beschritten werden: Die Antikörperbindung an eine antigene Determinante der Zelloberfläche führt entweder zur Agglutination oder bildet bei geeigneten Bedingungen den Auftakt für die Aktivierung des Komplementsystems.

Die erste Komponente dieses Systems - C1q - verbindet sich dabei mit einer speziellen Bindungsstelle in der H2-Region der schweren Ig-Kette im Fc-Anteil des Antikörpermoleküls, wonach dann C1r und von dieser in einem C a ⁺ ⁺ - a b h ä n g i g e n Reaktionsschritt die C1s-Komponente aktiviert wird (24).

Tab. 3: Charakteristika häufig beim serologischen Nachweis auftretender Antikörper

Ak-System	Anteil	Funktion	Struktur	Opt.Temp.	Entstehung	Besonderheit
ABO	meist auch	komplett inkomplett	IgM(IgA) IgG(IgA)	20°C 37°C	natürlich immunogen	Komplementfix.
RHESUS	meist selten kaum	inkomplett komplett Coombs-Ak.	IgG IgM(IgA) IgG	37°C 37°C 37°C	immunogen immunogen immunogen	
KELL	meist	Coombs-Ak.	IgG	37°C	immunogen	
DUFFY	meist	Coombs-Ak.	IgG	37°C	immunogen	Kompl.fix./Dosisseff.
KIDD	meist	Coombs-Ak.	IgG	37°C	immunogen	instabil
LEWIS	meist selten	komplett Coombs-Ak.	IgM IgM	4°C 37°C	natürlich immunogen	Komplementfix.
MNSS	meist	komplett	IgM	4°C	natürlich	Dosisseffekt
̄s:	selten meist	inkomplett Coombs-Ak.	IgG IgG	37°C 37°C	immunogen immunogen	
P	meist	komplett	IgM	16°C	natürlich	
LUTHERAN	meist	komplett	IgM	20°C	nat./immun.	
I	meist	komplett	IgM	20°C	natürlich	Autoantikörper

Wird die Kaskade von Aktivierungsschritten von C1 bis C9 voll durchlaufen, so kann es zur Freisetzung biologisch aktiver Mediatoren und schließlich zur Zellmembrandefekten und Hämoglobinaustritt kommen, was bei serologischen Agglutinationstesten störend wirken kann.

Schreitet die Aktivierung bis zur C3-Komponente fort, so können C3-Rezeptoren der Erythrozyten diese im menschlichen Serum reichlich vorhandene und nun aktivierte Komplementkomponente fixieren. Sie bilden dann geeignete Bindungspartner für Antikomplement-Antikörper, zum Beispiel Anti-C3b, die zusammen mit den Antikörpern gegen menschliches Immunglobulin eine ausreichende Vernetzung und damit einen positiven Coombstest bewirken.

Sofern das Antigen nämlich mehrere Determinanten trägt, was bei partikulären bzw. zellulären Antigenen stets der Fall ist, bildet sich ein Komplex aus zahlreichen Antigenen und Antikörpern - ein dreidimensionales Gitterwerk - , das makroskopisch als Präzipitat bzw. Agglutinat sichtbar wird.

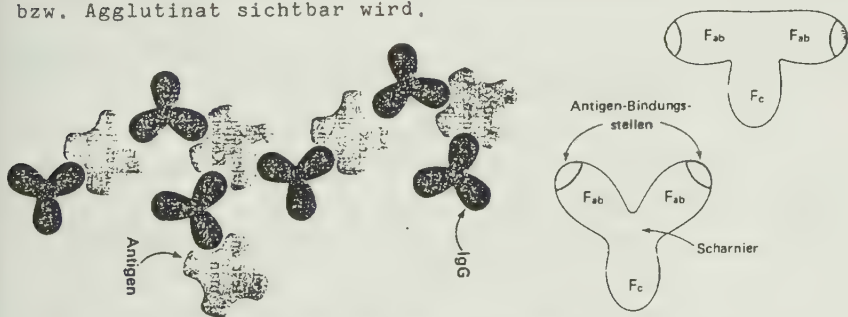


Abb.2: Schemazeichnung der Netzwerkbildung

Ein solches Raumgitter wird nur dann gebildet, wenn sich die Anzahl der antigenbindenden Valenzen und der antigenen Determinanten ungefähr entsprechen. Außerhalb dieses Äquivalenzbereiches kommt es zwar zu spezifischen Antigen-Antikörperverbindungen, aber große Agglutinate werden nicht mehr gebildet.

Zu einem hohen Vernetzungsgrad trägt auch die Y-förmige Grundstruktur der Immunglobulin-Monomere bei. Wie in Abb.2 angedeutet, sind die Fab-tragenden Arme über ein bewegliches Scharnier mit dem gemeinsamen Fußteil des Moleküls verbunden.

Eine rasche Änderung des Winkels zwischen den beiden Fab-Bereichen erlaubt eine Feinanpassung an geometrische Verhältnisse der Rezeptorverteilung.

1.6 Grundlagen und Methoden des Antikörpernachweises

Um Antikörper nachzuweisen, die Transfusionszwischenfälle auslösen könnten, sind drei große Gruppen von Methoden im Gebrauch, die sich durch ihre unterschiedliche Nähe zur Elementarreaktion - der spezifischen Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen - auszeichnen.

Tabelle 4 gibt einen Überblick und läßt die Bedeutung der verschiedenen Techniken sekundärer Testverfahren für die Blutgruppenserologie erkennen.

Tab.4: Antikörpernachweismethoden

Testform	Methodisches Prinzip	Minimal erfaßb. Ak-Menge (µg/ml)
Primär	Radioimmunassay	
	Radioimmunelektrophorese	0,02
	Immunfluoreszenztechniken	
Sekundär	Präzipitation in Lösung	20 - 30
	Präzipitation in Gelmilieu	40 - 50
	Agglutination: bakterielle	0,12
	Agglutination: direkte Hämaggl.	0,6 - 1,2
	Agglutination: indirekte "	0,03
	Komplementbindung	0,1 - 1
	Immunhämolyse	0,01 - 0,2
Tertiär	Passive kutane Anaphylaxie (Meerschweinchen)	0,02
	Frausnitz-Küstner-Reaktion	0,06

Nach F.J. GILL (17) und HUMPHREY J.H., WHITE R.G. (22)

1.6.1 Grundlagen

Der für die Blutgruppenserologie zentrale Agglutinationstest läßt sich in zwei Phasen auftrennen: der spezifischen Adsorption des löslichen Antikörpers durch ein membranständiges Blutgruppenantigen folgt die makroskopische Sichtbarwerdung in Form eines Agglutinates, falls die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes aus Erythrozyten und immunologischen Brückengliedern möglich gewesen ist.

Neben Eigenschaften von Antigen und Antikörper, die vorwiegend die erste Phase beeinflussen, sind es die physiko-chemischen Parameter des Milieus, in dem die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper abläuft, welche sowohl Prozesse der ersten als auch zweiten Phase beeinflussen.

Antikörperaufladung wie Gitterbildung und damit die Agglutinationsstärke hängen von der manipulierbaren Zusammensetzung des Verstärkermediums ab.

Folgende Größen eignen sich besonders für die Beschreibung der Wechselbeziehungen zwischen Reaktionspartnern und -umgebung:

- der pH-Wert

Nach Untersuchungen von HUGHES-JONES am Anti-D-Modell gibt es einen optimalen pH-Wert des Mediums, bei dem die Gleichgewichtskonstante K_a für die Antikörperadsorption ein Optimum aufweist (21).

- Die Ionenstärke

Nach weiteren Untersuchungen von HUGHES-JONES und weiteren Autoren (2, 29, 41, 48, 49) führt eine Senkung der Ionendichte um die Erythrozyten zu einer Steigerung von Grad und Geschwindigkeit der Ak-Adsorption.

HUGHES-JONES fanden im Anti-D-Modell bei einer Reduktion der Ionenstärke der Suspensionslösung auf 1/5 des physiologischen Wertes (0,16 M) - etwa 0,03 M - eine Erhöhung der Antikörperbindungsgeschwindigkeit auf das tausendfache. Der Grund dafür ist

die Verringerung der Zahl geladener "Konkurrenten" um einen Platz am Membranrezeptor.

Allerdings bedeutet eine derart niedrige Ionenstärke auch eine Gefahr:

Komplementfaktoren und andere biologische Makromoleküle binden sich als geladene Partikel unspezifisch an die antigenen Determinanten und können so zu falsch positiven Ergebnissen im Agglutinationstest führen.

Die untere Grenze zur Unspezifität liegt nach Arbeiten von MOORE und MOLLISON bei einer Ionenstärke im Endansatz von 0,06 - 0,07 M (33).

- das Zetapotential

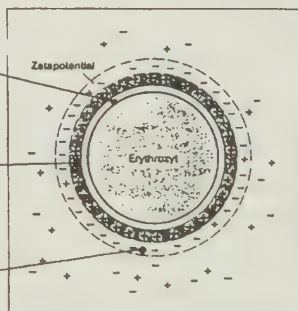
Über die Potentialdifferenz verschiedener Ladungssphären des Erythrozyten wird die mittlere Zelldistanz reguliert, die von den Antikörpern oder Antihumanantikörpern überwunden werden muß, damit ein dreidimensionales Gitterwerk entstehen kann.

Abb.3: Das Zetapotential

A: Erythrozytenmembran mit neg. geladenen Strukturkomponenten

B: Unverschiebbliche Schicht aus positiv geladenen Ionen der umgebenden Suspensionslösung

C: Bewegliche Ionenschicht mit überwiegend negativen Ladungen



Nach SPIELMANN W., KUHN P. (46)

Das Maß der elektrostatischen Abstoßung zwischen den partikulären Ionensphären - das Zetapotential - wird vor allem von der Dielektrizitätskonstante des Suspensionsmediums reguliert (46).

Eine Zusammensetzung für ein Verstärkermedium zu finden, bei der diese Größen - pH-Wert, Ionenstärke und Zetapotential - einen optimalen Effekt auf die Agglutinationsstärke entfalten, ist oft mit dem Problem antagonistischer Wirkungen verbunden.

So wird zum Beispiel bei einer Verringerung der Ionendichte um die Zellen die Reaktion der ersten Phase, die Antikörperadsorption, begünstigt, wegen der damit verbundenen Senkung der Dielektrizitätskonstante aber zugleich das Zetapotential erhöht und die Gitterbildung in der zweiten Phase der Agglutination für die kleineren IgG-Moleküle erschwert.

So ist es kaum verwunderlich, daß auf der Grundlage prinzipieller Variabilität der elementaren Reaktionspartner - Blutgruppenantigen und korrespondierender Antikörper - und unterschiedlicher Möglichkeiten, ihre spezifische Interaktion im Agglutinationstest mit optimalem Zeit- und Materialaufwand nachzuweisen, ein Spektrum von Testmethoden entwickelt wurde, die das eine oder andere Prinzip der Agglutinationsverstärkung verfolgen.

Erst ihre Kombination zu Nachweissystemen unterschiedlicher Zielsetzungen wie Verträglichkeitstest (Kreuzprobe), Antikörpersuch- oder -identifikationstest erlaubt ein Maß von Validität und Reliabilität der Methodik im klinischen Routinebetrieb, das ein folgenreiches Übersehen einer kritischen Antikörperspezifität im Patientenblut ausschließen kann.

1.6.2 Methoden des Antikörperrnachweises

1.6.2.1 Der Albumintest

Bis zum Jahre 1945 verwendete man für Agglutinationsteste - nicht nur in der Blutgruppenserologie, sondern auch in der Bakteriologie - physiologische Kochsalzlösungen als Suspensionsmedien für die antigentragenden Erythrozyten und inkubierte sie mit dem antikörperhaltigen Probandenserum bei Raumtemperatur (46).

Diese NaCl-Lösung verringert das Zetapotential aber nicht so weit, daß inkomplette Antikörper des Typs IgG, die nur zwei Ag-Bindungsstellen bei einer Aktionslänge von etwa 24 nm aufweisen, die minimale Distanz der Membranoberfläche zweier Erythrozyten überbrücken könnten.

Geht man nämlich von einem Wert von 15 nm für die Dicke der doppelten Ionenatmosphäre aus, die jede Zelle in 0,89%iger Kochsalzlösung umgibt, so sind nur größere, komplette Antikörper wie zum Beispiel IgM-Moleküle mit 10 Antigenbindungsstellen bei einer Aktionslänge von 35 - 42 nm in der Lage, den immunologischen Brückenschlag über die Mindestdistanz von 30 nm hinweg zu vollführen.

Nach der Entdeckung des Rhesus-Systems im Jahre 1940 brachte die Notwendigkeit, die meist inkompletten Antikörper dieses für die Transfusionspraxis und die Pathogenese des Morbus hämolyticus neonatorum so bedeutsamen Blutgruppensystems nachweisen zu können, erste brauchbare Methoden hervor.

Als Reaktionsmilieu verwendete man nun das Probandenserum oder antikörperfreie Seren von Menschen der Blutgruppe AB, später erwiesen sich auch einfache tierische Eiweißkörper, wie Gelatine oder sogar synthetische Kolloide, wie Polyvinylpyrrolidon oder Dextran, als geeignete Milieuzusätze für den Nachweis inkompletter Antikörper (46).

Wegen der Gefahr unspezifischer Geldrollenbildung bei diesen synthetischen Kolloidlösungen ging man später dazu über, 20 - 30%ige Rinderserum-Albuminlösungen zu verwenden (47).

Die agglutinationsfördernde Wirkung der allgemein auch Supplement(=Hilfsmittel zur Agglutination bei inkompletten Antikörpern) genannten Albuminlösung hängt mit der dipolaren Struktur des Eiweißmoleküls zusammen: das elektrische Dipolmoment interagiert mit der ionalen Doppelschicht der Erythrozyten.

Translations- und Rotationsbewegungen der Dipole entziehen dem elektrischen Feld, das die einzelnen Zellen umgibt, Energie - die Dielektrizitätskonstante der Lösung steigt, das Zetapotential sinkt.

Die verringerte Distanz zwischen den Erythrozyten erlaubt es jetzt auch den kleineren IgG-Molekülen inkompletter Antikörper, ein Netzwerk aus immunologischen Brückengliedern und zellulären Brückenköpfen aufzubauen, d.h. ein Agglutinat zu bilden.

Da es aber bei zu starker Reduktion des Zetapotentials außer zu unspezifischen Aggregationen auch zu einer Ablösung von Antikörpern von ihren spezifischen Rezeptoren kommen kann, empfiehlt sich die Einhaltung bestimmter Optimalbereiche.

Ein Beispiel dafür geben die kritischen Werte für das Zetapotential im Anti-D-Modell:

Tab.5: Kritische Werte des Zetapotentials

	IgM-Anti-D	IgG-Anti-D
Einsetzen der Agglutination	20 - 22 mV	10 - 11 mV
Vollständige Agglutination	17 - 18 mV	4,5 - 9 mV

Da es sich beim Albumintest um eine Nachweismethode für inkomplette Immunkörper handelt, deren Reaktionsoptimum bei 37°C liegt, inkubiert man den Ansatz 45 - 60 Minuten lang im Wasserbad (46).

Andere Tests, wie der Antiglobulin-Test oder diverse Enzymtechniken übertreffen meist den Albumintest an Empfindlichkeit.

1.6.2.2 Der LISS-Test

Zu den gut kontrollierbaren Eigenschaften eines Verstärkerreagens zählen der pH-Wert und die Ionenstärke.

Bei Lösungen niedriger Ionenstärke (LISS=Low Ionic Strength Solution) führen, wie Arbeiten von HUGHES-JONES und POLLACK zeigen konnten, unter das physiologische Niveau gesenkte Werte für pH und Ionenstärke des Reaktionsmilieus zu einer verbesserten Antikörperadsorption an die antigenträgenden Erythrozyten (21, 39); die Zahl ladungstragender "Konkurrenten" für das Antikörper-Molekül um eine elektrostatische Bindung an den Rezeptor wird vermindert.

Weitere Erfahrungen lehrten, daß man die mit der Verringerung der Ionenstärke einhergehende Erhöhung des Zetapotentials durch Zugabe von hochmolekularen Substanzen wie zum Beispiel Rinderse-
rum-Albumin mehr als wettmachen konnte.

Wie beim Albumintest beschrieben, läßt sich mit dem Albuminzusatz zur wäßrigen LISS-Lösung eine Stabilisierung und insgesamt erhöhte Dielektrizitätskonstante und damit ein reduziertes Zetapotential erreichen.

Verbunden mit der Senkung von pH-Wert und Ionenstärke führt diese Kombination günstiger Bedingungen für Reaktionen der ersten wie zweiten Phase einer Hämagglutination zu einer optimalen Antikörperadsorption und zu verbesserten geometrischen Voraussetzungen für die Netzwerkbildung.

Der große Vorteil der LISS-Technik liegt in der verkürzten Inkubationszeit (5 - 10 Min.) bei einer Temperatur von 37°C. Bei Verlängerung der Inkubationszeit treten außerdem keine unspezifischen Ergebnisse auf (16).

1.6.2.3 Der Enzymtest

Mit diesem Test lassen sich i n k o m p l e t t e Antikörper auch im Kochsalzmilieu nachweisen.

Die große Bedeutung für den Nachweis schwacher Antikörper, besonders des Rh-Systems, wenn eine Immunisierung schon längere Zeit zurückliegt, erkannten MORTON und PICKLES schon 1947, als sie den Enzymtest wegen seiner besonderen Sensibilität bei einigen Antikörperspezifitäten mit großer klinischer Bedeutung (v. a. die des Rhesussystems) als Zusatztest bei unklaren Transfusionsreaktionen empfahlen (9).

Das Wirkungsprinzip dieses Testes besteht darin, daß proteolytische Enzyme wie Ficin, Trypsin, Bromelin und Papain Phosphatidbindungen an der Erythrozytenoberfläche haftender Mukoide spalten.

Die Membranoberfläche wird dabei nivelliert und antigene Rezeptoren werden für die Antikörpermoleküle zugänglicher.

Neben der verbesserten Antikörperadsorption kann auch die fermentative Abspaltung geladener Membrankomponenten oder der albuminanaloge Mechanismus der Reduktion des Zetapotentials zur Agglutination beitragen.

Das pflanzliche Thiolenzym Papain zum Beispiel hat einen isoelektrischen Punkt von 8,75 und liegt als dipolares Partikel im Suspensionsmilieu des Einstufen-Papain-Tests vor.

Dem Vorteil hoher Empfindlichkeit bei kurzer Inkubationszeit (ca. 10 - 30 Min. bei 37°C) steht allerdings die generelle Neigung zu unspezifischen Reaktionen, die geringe Toleranz gegen leichte Abweichungen von der vorgeschriebenen Technik und der Wirkungsverlust bei Blutgruppen wie M, N, Duffy und Lewis entgegen, wobei Rezeptoren der ersteren enzymatisch angegriffen und die Hämolyse-Wirkung von Antikörpern der letzteren wesentlich verstärkt werden (47).

Die Enzymtests lassen sich als Einstufen- oder Zweistufentests durchführen.

Während beim Einstufentest Serum, Erythrozytensuspension und eine geeignete Enzymverdünnung gleichzeitig miteinander vermischt und inkubiert werden, geschieht dies im anderen Fall erst nach separater, enzymatischer Vorbehandlung der Erythrozyten und anschließender Entfernung des nicht verbrauchten Enzyms.

Die Zweistufentests sind in der Regel empfindlicher, doch lassen sich wie bei den Thiolenzymen Bromelin und Papain auch durch Enzymaktivatoren wie Mercaptoäthanol oder S-haltige Aminosäuren Wirkungsverstärkungen ohne zusätzlichen Arbeitsaufwand erzielen (46).

1.6.2.4 Der Antihumanglobulintest

Das Reaktionsprinzip dieses Testes wurde erstmals von MORESCHI im Jahre 1908 beschrieben, und der darauf basierende AHT oder AHG-Test von COOMBS, MOURANT und RACE nach 1945 in die blutgruppenserologische Routinepraxis eingeführt (9).

Er ermöglicht den Nachweis von sogenannten Coombs-Antikörpern, d. h. im Supplement- oder Enzymtest nicht agglutinierende Immunglobuline werden durch zwei aufeinanderfolgende spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen zu einer immunologischen Brückenbildung befähigt.

In der ersten Reaktion bindet sich menschliches Immunglobulin einer bestimmten Spezifität an den korrespondierenden Membranrezeptor.

Nachdem der Antikörperüberschuß durch mehrmaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt wurde, können Antikörper tierischer Herkunft (Kaninchen oder Ziege), die gegen e i n e oder a l l e Klassen (mono- bzw. polyspezifisches Coombsreagens) menschlicher Immunglobuline gerichtet sind, die bereits spezifisch adsorbierten Blutgruppenantikörper in einer zweiten Antigen-Antikörper-Reaktion miteinander vernetzen (1).

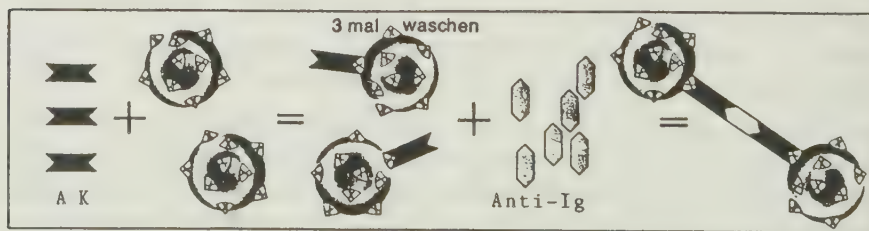


Abb.4: Reaktionsablauf beim indirekten Coombstest

Die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Antigen und Antikörper sind stark genug, das mehrfache Waschen in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur zu überstehen.

Sind Antikörper bereits in vivo an die Erythrozytenmembran gebunden worden, entfällt die Primärreaktion der Sensibilisierung, und man spricht von einem *d i r e k t e n* Coombstest.

Schließt der Antihumanglobulintest neben der obligatorischen Antiglobulin- auch die Sensibilisierungsphase ein, handelt es sich um einen *i n d i r e k t e n* Coombstest.

Enthält ein Coombsreagens neben Antikörpern gegen menschliches Immunglobulin auch solche gegen Komponenten des Komplementsystems, so steigert sich seine *S e n s i t i v i t ä t* erheblich.

Eine Gruppe schwierig nachzuweisender Antikörper - die komplementbindenden Antikörper (z.B. ein Teil der DUFFY- und KIDD-Ak) - entzieht sich diesem Breitspektrum-Coombsserum nun in der Regel nicht mehr (1).

Bei komplementbindenden Antikörpern muß das Probandenserum die Komponenten C1 - C9 und das AHG-Reagens Antikörper gegen Komponentekomponenten enthalten, damit sich nach spezifischer Adsorption der Antikörpermoleküle mit der Anlagerung von C1q-Untereinheiten an die Komplementbindungsstelle in den Fc-Teilen eng benachbarter Moleküle der Aktivierungsprozess entfalten kann, der dann aktiviertes C3 an die große Zahl vorhandener Membranrezeptoren fixiert und damit immunologische Haftpunkte für Antikomplement-Antikörper setzt (24).

Neben den blutgruppenspezifischen antigenen Rezeptoren sind so auch die Membranrezeptoren für die Alpha 2- und Beta-Globuline des Komplementsystems (vor allem für die Komponenten C3 und C4) zu immunologischen Brückenköpfen geworden.

Zu den komplementbindenden Antikörpern gehören in erster Linie Angehörige der IgG-Subklasse IgG3, etwas weniger auch IgG1 und IgG2, während IgM eine geringere und IgA sowie IgG4 keine nennenswerte Rolle spielen (10).

1.6.3 Der Mehrstufentest

Meist findet der AHG-Test als Mehrstufentest Verwendung; er kombiniert historische Vorläufer und selektive Einzelmethoden zu einer Sequenz, die es erlaubt, gewisse Grundkategorien von Antikörpern zu unterscheiden, je nachdem, auf welcher Stufe beispielsweise eines Drei-Stufen-Tests sie in Erscheinung treten.

Auf der ersten Stufe - der NaCl-Phase - werden Erythrozytensuspension und antikörperhaltige Probe in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur vermischt.

Starke Iso-, Autoantikörper(Anti-I) oder Hämolysine(Anti-Le) sowie natürlich vorgebildete Kälteantikörper wie Anti-M und -N können hier bereits zu Agglutinationen führen.

Während der zweiten Stufe - der sogenannten Inkubationsphase - kann die Sensibilisierung d.h. die spezifische Antikörperaufladung der Erythrozyten mit verschiedenen Verstärkerreagenzien (Albumin, LISS, Enzym) auf erhöhtem Temperaturniveau (37°C) unterstützt werden.

Viele inkomplette Antikörper lassen sich in dieser Phase als Immun- oder Autoantikörper mit erweiterter Wärmeamplitude nachweisen.

Auf der dritten Stufe - der Antiglobulinphase des AHG-Tests - wird nach mehrmaligem Waschen das Coombsreagens zugesetzt.

Dank der hohen Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Testmethodik werden nun in der Regel die meisten Coombs- und komplementbindenden Antikörper erfaßt (1).

1.7 Ein neuer Agglutinationsverstärker

Im Jahre 1968 griffen LALEZARI und JIANG in die Diskussion um ein effektives und sicheres Routineprogramm für die Transfusionsvorbereitung mit dem methodischen Konzept einer Aggregationsvermitt-

lung über quarternäre Ammonium-Polymere ein (27).

Ein Potentiatorsystem auf Polykationenbasis - dem P o l y b r e - n e ^R - hatte im automatisierten Antikörpernachweis bereits erfolgreich Anwendung gefunden und wurde von den Autoren für den manuellen Gebrauch bei allen Formen des Antikörpernachweises weiterentwickelt (26).

Dieser manuelle Polybrene-Test verbindet nach ersten Erfahrungen (26, 9) eine hohe Sensitivität (v.a. bei Rhesusantikörpern) und tolerable Reaktivität auf klinisch irrelevante Kälteantikörper (9) mit einer sehr kurzen Inkubationszeit.

Außerdem ist er vom Testprinzip her unabhängig von Antikomplementärfaktoren und Ca^{++} -Stabilisatoren im Coombs- bzw. Albuminreagenz (vgl. 36).

Drei Phasen zeichnen diesen Test aus:

In der ersten Phase sorgt eine LISS-Lösung für eine verbesserte Adsorption spezifischer Antikörper.

In der zweiten Phase wird durch das Polykation Hexadimethrinbromid(Polybrene^R) das Zetapotential so stark verringert, daß es nicht nur zu Prozessen der spezifischen Agglutination, sondern hauptsächlich zu einer unspezifischen Aggregation der Erythrozyten kommt.

In der dritten Phase wird durch Zugabe von Na-Citrat im Überschuß der allergrößte Teil der unspezifischen Verbindungen aufgelöst.

Die Stärke der jetzt verbliebenen Agglutination entspricht der spezifisch immunologischen Brückenbildung während der Aggregationsphase und ist von der Konzentration der elementaren Reaktionspartner - Antigen und Antikörper - sowie den kinetischen Charakteristika der ganzen Reaktion her bestimmt.

1.8 Problemstellung

Wegen der Vorteile des Polybrene-Tests liegt die Frage nahe, inwieweit diese bisher auf Autoanalyser- und Spezialteste beschränkte und von LALEZARI/JIANG weiterentwickelte Methode eine effektive Bereicherung für die Routinepraxis eines Blutgruppenlabors darstellen könnte.

Diese Arbeit setzte sich zum Ziel, Antworten auf folgende Fragen zu finden:

- 1) Bietet der Polybrene-Test gegenüber den herkömmlichen Verfahren Vorteile für die Transfusionsmedizin im Hinblick auf eine
 - a) erhöhte Sensitivität für Antikörper?
 - b) schnellere Durchführung der transfusionsspezifischen Tests?
 - c) einfache Handhabung?
- 2) Lassen sich bei den Reagenzien verschiedener Hersteller für herkömmliche Testverfahren (LISS- und Albumintest) Unterschiede in der Verstärkerwirkung feststellen?
- 3) Gibt es unterschiedliche Testergebnisse, je nachdem, ob die Antikörper in Plasma- oder Serumproben untersucht wurden?
- 4) Zeigen sich bei Verwendung von homo- oder heterozygoten Testzellen deutliche Unterschiede in der Reaktionsstärke?
- 5) Welche Kombination von Testverfahren kann für das transfusionsvorbereitende Routineprogramm empfohlen werden?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenproben

Wir untersuchten insgesamt Proben von 34 Patienten, bei denen zu einem früheren Zeitpunkt bereits Antikörper gegen insgesamt 16 verschiedene Blutgruppensysteme nachgewiesen worden waren.

Es wurde jeweils eine Blutprobe mit und ohne Stabilisatorzusatz(EDTA) gewonnen.

Bei 7 der 32 Patienten standen uns lediglich Serumproben zur Verfügung.

Wurden abgenommene Proben nicht am selben Tag verarbeitet, füllten wir Serum- und Plasmaproben in testgerechten Quantitäten in kleine Kunststoffbehälter und lagerten sie bei -40°C .

Am Testtag wurden dann die Proben im Warmbad aufgetaut und bis Testbeginn auf Zimmertemperatur(20°C) gebracht.

2.2 Untersuchungsmethoden

Der komplette Versuchsplan für jede Patientenprobe umfaßte 32 geometrische Verdünnungsreihen (jeweils bis zur Mindesttiterstufe 1:16) für den quantitativen Agglutinationstest, dessen drei Grundelemente - antikörperhaltige Patientenprobe, VerstärkermEDIUM/-methode und Antigendosis des Testerythrozyten - systematisch variiert wurden:

Tab.1: Zustandekommen der 32 Verdünnungsreihen

Antikörper ge- löst in	Anzahl variierten Medien	Testzellsorten je Medium
Serum	10	2
Plasma	6	

Die 10 (6) Reagenzien zur Agglutinationsverstärkung gehörten zu vier Wirkungstypen.

Jeweils 4 (2) Medien waren Produkte verschiedener Hersteller von Rinder-Albumin- bzw. LISS-Lösungen.

Ein Papain-Reagenz vertrat den Wirkungstyp des einstufigen Enzymtestes.

Das Polybrene^R-Potentiatorsystem von Merz&Dade repräsentierte das neue Prinzip der Aggregationsvermittlung über Polykationen.

Jede Medienvariante wurde prinzipiell gegen zwei Zellsorten getestet; bei einer waren die genetischen Anlagen für das Testantigen auf der Membran homozygot, bei der anderen heterozygot vertreten.

Nach dem Muster des Drei-Stufen-Testes im Zentrifugierröhrchen hielten wir jeweils am Ende einer durchgeführten Phase - supplementfreie Raumtemperaturphase, Inkubation mit Supplement bei 37°C oder abschließende Coombsphase - das Agglutinationsergebnis in Form eines Punktwertes fest (s. 2.5).

2.3 Ablauf der Untersuchung

2.3.1 Die Verdünnungsreihe

Um den Effekt des im Plasma blockierten Komplementsystems auf den Nachweis komplementabhängiger Antikörper im AHG-Test beurteilen zu können, verwendeten wir zur Verdünnung der Serum- bzw. Plasma-proben Serum bzw. Plasma von Blutspendern der Blutgruppe AB.

Das AB-Serum bzw. -Plasma verschiedener Spender wurde zu einem Pool vereinigt und portioniert bei -40°C gelagert.

Für jede Verdünnungsreihe wurden 7 Glasröhrchen bereitgestellt und in jedes, mit Ausnahme des ersten 100 µl AB-Serum bzw. AB-Plasma vorgegeben.

Nach Einpipettieren von 100 µl Patientenserum bzw. -plasma in die ersten beiden Röhrchen wurde der Inhalt des zweiten durch fünfmaliges Aufziehen und Ausblasen der Eppendorf-Mikropipette intensiv gemischt und davon 100 µl in das dritte Röhrchen überpipettiert.

Diese Prozedur wiederholte sich bis zum 7. Röhrchen, das die letzte Titerstufe(1:16) für eine eventuelle Weiterverdünnung reservieren sollte.

Für den Polykationenansatz legten wir nach Vorversuchen wegen der regelmäßig hochtitrigen Testergebnisse von Anfang an eine 12-stufige Verdünnungsreihe fest.

2.3.2 Die Testerythrozyten

Die zum untersuchten Antikörper komplementären Testerythrozyten waren entweder als 5%ige Erythrozytensuspension in isotonischer Kochsalzlösung bereits in fertigen Testzellpanels (Biotestcell-I oder Data-Cyte Plus) verfügbar oder wurden von komplett typisierten Spendern zur Verfügung gestellt.

Im letzteren Falle wurde das EDTA-stabilisierte Spenderblut bei 125facher Erdbeschleunigung - das relative Zentrifugalfeld(RCF) betrug bei ca. 1000 U/Min. und 11cm Rotorradius 125g - zehn Minuten lang zentrifugiert, dann der Überstand verworfen und den Erythrozyten anschließend tropfenweise Waschlösung zugefügt.

Aus den dreimal gewaschenen Erythrozyten und isotonischer Kochsalzlösung stellten wir eine etwa 3-5%ige Erythrozytensuspension für den aktuellen Bedarf her.

Jede Erythrozytensuspension untersuchten wir im direkten Coombs-test (mit Coombsseren der Firmen Biotest, DiaMed, Ortho Diagnostics und Molter) auf Auto-Antikörper, die in der AHG-Phase eine falsch positive Reaktion hätten bewirken können.

Von den fertigen Testzellsuspensionen, die jeweils Erythrozyten mit homo- oder heterozygoter Anlage für membranständige Rezeptoren der untersuchten Antikörperspezifität enthielten, pipetierten wir 50 µl in jedes der 6 bzw. 12 Röhrchen einer Verdünnungsreihe ein und mischten gründlich.

2.3.3 Zentrifugieren und Ablesen

Nach Inkubation der Ansätze für je nach Teststufe und -methode unterschiedliche Zeiten bei Raum- oder Wasserbadtemperatur (37°C) wurden die Testansätze 1 Minute lang bei 1000 U/Min zentrifugiert, das Sediment vorsichtig aufgeschüttelt und gegen einen hellen Hintergrund auf Agglutination hin makroskopisch, im Zweifelsfall auch mikroskopisch abgelesen.

2.3.4 Medienzugabe und Inkubationszeiten

Von den folgenden 10 agglutinationsverstärkenden Reagenzien der vier Wirkungstypen - LISS-, Enzym-, Polykationen- und Albuminlösung - wurden bei Serumproben alle, bei Plasmaproben nur das erste und letzte Reagens der vier LISS- bzw. Albuminmedien verwendet.

-LISS-Medien:

1) DIALISS

Dieses modifizierte LISS-Reagens der Firma DiaMed ist eine wässrige Lösung mit einer Ionenstärke von $I = 0,02$.

2) MLB

Eine ebenfalls modifizierte LISS-Lösung der Firma Biotest. Bei modifizierten Lösungen wird eine Ionenstärke im Endansatz erreicht, die dem Reaktionsoptimum auch ohne Waschen der Testzellen in LISS-Milieu nahe genug kommt.

3) ENLISST

Die LISS-Lösung der Firma Merz & Dade ist eine wässrige, phosphatgepufferte 0,01-molare NaCl-Lösung, die Glyzin, Rinderalbumin und Gelatine enthält. Als Konservierungsmittel ist Thimerosal zugegeben.

4) REACTIN

Dieses Produkt der Firma Ortho Diagnostics ist ebenfalls eine wässrige, phosphatgepufferte LISS-Lösung mit Glyzin und Thimerosal als stabilisierenden Zusätzen.

Auf der zweiten Stufe des Drei-Stufen-Testes wurden von den ersten drei LISS-Lösungen dem Ansatz jeweils 200 µl, von der REACTIN-Lösung 100 µl - entsprechend 4 bzw. 2 Tropfen - kurz vor der Inkubation im 37°C-Wasserbad zugegeben, um einen Reaktivitätsabbau länger in LISS-Lösungen suspendierter Zellen zu vermeiden (33).

Sämtliche LISS-Ansätze wurden für 10 - 15 Minuten im Warmbad gehalten, anschließend sofort zentrifugiert und abgelesen.

-Enzym-Medium:

Das Ferment Papain der Firma Biotest Diagnostics wird als Trockensubstanz mit 5 ml Aqua dest. aufgelöst und stand nach Wärmeschränkaktivierung (37°C) als gebrauchsfertige Lösung zur Verfügung.

Die Verdünnungsreihe wurde mit AB-Serum/Plasma bei einem Überpipettierungsvolumen von 50 µl hergestellt und jedem Röhrchen jeweils weitere 50 µl der Erythrozytensuspension und der Papain-Lösung beigegeben.

Nach kräftigem Schütteln kam der Ansatz für ca. 30 Minuten ins Warmbad.

Im Anschluß daran zentrifugierten wir bei 1 000 U/Min für 2 Minuten und lasen nach vorsichtigem Aufschütteln des Sedimentes gegen eine indirekte Lichtquelle ab.

-Polykationen-Medium:

Das Polykation-Potentiator-System POLYBRENE^R der Firma Merz & Dade setzt drei gebrauchsfertige Reagenzien ein:

1) Low Ionic Medium

Die wäßrige LISS-Lösung enthält Monosaccharide.

2) Aggregation Solution

Die wäßrige Aggregationslösung enthält das synthetische Polykation Polybrene (Hexadimethrinbromid).

3) Resuspension Medium

Eine hypertone Salzlösung

Alle drei Reagenzien enthalten Na-Azid(1:1000) als Stabilisator.

Im Gegensatz zum PAPAIN-Test fand der POLYBRENE-Test bei Raumtemperatur statt, ließ die zweite Stufe der Wärmeinkubation aus und schloß mit der Antiglobulinphase des indirekten Coombstests ab.

Wir führten den Polybrene-Test nach folgendem Schema durch:

1. Röhrchen(10*75 mm) für den Test und die negative Kontrolle beschriften.
2. a) 2 Tropfen Patientenserum/-plasma aus der zuvor hergestellten Verdünnungsreihe einbringen.
b) 2 Tropfen antikörperfreies AB-Serum/Plasma in das Röhrchen für die negative Kontrolle geben.
3. 1 Tropfen(ca. 50 µl) 3 - 5%ige Erythrozytensuspension in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
4. 1 ml Low Ionic Medium per Spender in jedes Röhrchen geben und gut mischen.
5. Ansätze 1 Minute, aber nicht länger als 30 Minuten, bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 2 Tropfen Aggregation Solution einbringen und mischen.
7. Ansätze 15 Sekunden, aber nicht länger als 1 Minute, bei Raumtemperatur stehen lassen.
8. Röhrchen zentrifugieren und den Überstand vollständig abgiessen, danach in einen Ständer stellen und die am Boden klebenden Erythrozyten leicht aufschütteln.
9. 2 Tropfen Resuspension Medium in jedes Röhrchen innerhalb von 5 Minuten eintropfen, um ein leichtes Resuspendieren zu gewährleisten.
10. Ohne Schütteln die Röhrchen auf dem Ständer oder jeweils 6 Röhrchen auf der Milchglasscheibe der Lichtquelle leicht rotierend bewegen und auf bleibende Agglutination achten. Orientierung an einer negativen Kontrolle empfehlenswert. Die Ablesung muß innerhalb von 1 Minute nach Zugabe des Resuspensions-Mediums erfolgen. Die Ablesung kann nicht wiederholt werden.

-Rinderalbumin-Medien(22%ig):

- 1) der Firma DiaMed
- 2) der Firma Merz & Dade
- 3) der Firma Ortho Diagnostics
- 4) der Firma Molter

Wir beschickten die Supplementansätze mit jeweils 100 µl Albuminlösung und inkubierten sie 45 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde 1 Minute bei 1000 U/Min zentrifugiert und abgelesen.

2.3.5 Der abschließende Antihuman-Globulin-Test (AHG)

Der AHG-Test wurde nach der Albumin- bzw. LISS-Inkubation sowie nach dem Papain- bzw. Polybrene-Ansatz durchgeführt.

Wir verwendeten AHG-Seren der Firmen Dade & Merz, Ortho und Molter, die wir vor Gebrauch mit den Coombskontrollzellen der Hersteller auf Reaktivität prüften.

Bei diesen Seren handelte es sich um Breitbandcoombsseren mit folgenden Komponenten:

Anti-IgG	Anti-C3
Anti-IgM	Anti-C4d
Anti-IgA	Anti-C3d

Jeweils 2 Tropfen dieser Seren wurden den zuvor dreimal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschenen, bereits auf einer der beiden vorigen oder beiden Stufen resuspendierten und abgelesenen Erythrozyten zugesetzt, das Ganze durch Schütteln gemischt und nach dem Zentrifugieren bei 1200 U/Min für 2 Minuten sofort vor hellem Hintergrund auf Agglutination geprüft.

Für diesen Coombstest verwendeten wir die DiaCent Zellwaschzentrifuge der Firma Merz & Dade, die die Coombsserum-Zugabe, das dreimalige Waschen und Zentrifugieren in automatisierter Technik durchführte.

2.4 Testkontrollen

- a) Erythrozytensuspensionen, die selbst hergestellt worden waren, wurden mit den oben genannten polyspezifischen Coombs-seren auf Autoantikörper untersucht.
- b) Die Verstärkermedien wurden an jedem Testtag in einem Probelauf mit anti-D-haltigem Serum mittlerer Titerstufe auf ihre Reaktivität geprüft.
- c) AHG-Seren testeten wir mit den beigegebenen Coombskontrollzellen; dabei wurde das am Testtag verwendete Serum einer äquivalenten Menge dreimal gewaschener Coombszellen zugesetzt, zentrifugiert und abgelesen.

2.5 Bewertung der Agglutinationsstärke

In Titrationsstudien erwies sich eine numerische Quantifizierung für Analysen und Vergleiche als vorteilhaft gegenüber einer Titerangabe der letzten noch positiven Verdünnungsstufe in einer geometrischen Verdünnungsreihe.

Aus diesem Grunde verwendeten wir in Anlehnung an W.L. MARSH (30) ein Punktwertsystem, das den beobachteten Agglutinationsgraden eine kontinuierliche Punktskala von 0 bis 12 zuordnet.

Tab.2: Punktesystem für die makro- bzw. mikroskopische Ablesung der Agglutinationsstärke

Punkte	Makroskop. Bild	Mikroskop. Bild
12	Komplette Agglutination. Ein großes Agglutinat	Keine freien Zellen
11	Starke Reaktion. Ein bis	Einzelne Massen aggluti-
10	zwei große Agglutinate	nierter Zellen

9	Starke Reaktion. Eine Reihe	Große Aggl. in einem Meer
8	großer Agglutinate	kleiner Zellhaufen und verstreuter Einzelzellen
7		
6	Viele kleine Agglutinate	Viele Aggl. aus bis zu 20 Zellen
5		vor einem Hintergrund aus freien Zellen und kleinen Zellhaufen
4	Feine Körnung der Zellsuspension	Vereinzelte Aggl. von 6-8 Zellen und freie Zellen
3		
2	Klare Lösung	Ein paar kleine Trauben aus 3-4 Zellen in einem Meer freier Zellen
0	Klare Lösung	Keine Agglutinate

Nach MARSH W. L. (30)

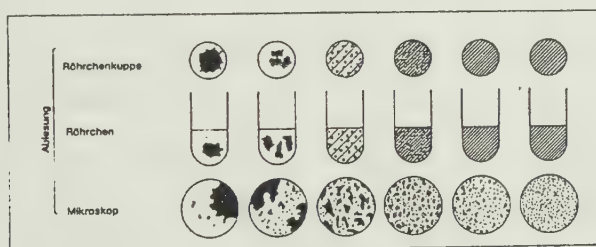


Abb. 1 Stärkegrade einer Agglutination (46)

3. Ergebnisse

3.1 Sensitivitätsvergleich

Im Gegensatz zu den Testansätzen mit Enzym, LISS und Albumin ließen sich alle von uns getesteten Antikörper(Ak) mit der Polybrene-Technik nachweisen.

Wie sich die 34 untersuchten Antikörper auf die 16 verschiedenen Spezifitäten und vier Kombinationen aus Probenherkunft und Testzellart verteilt haben, zeigt Tabelle 3.1.1, während die umseitig folgenden Tabellen die Versagerquoten - bezogen auf eine Klasse oder das gesamte Spektrum der untersuchten Antikörper - für die 10 Verstärkermedien, dem dritten Variationsfaktor, angeben.

Tab.3.1.1 Zahl der Ansatzvarianten und Ak je Ak-Spezifität

Ansatz-varianten	D	E	C ^w	K	K̄	Kp ^a	Fy ^a	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	S	S̄	P	Yt ^a	SUM
	5	1	2	5	1	1	5	1	1	5	1	1	1	1	1	2	
S-HO	5	1	2	5	1	-	5	1	1	-	-	1	1	1	1	2	21
-HE	5	1	-	5	1	1	5	1	1	5	1	1	1	1	-	-	28
P-HO	5	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	1	1	-	2	16
-HE	5	-	-	5	-	1	5	-	-	5	1	-	1	1	-	-	24
Summe	20	2	2	20	2	2	20	2	2	10	2	2	4	4	1	4	98

Aus den Tabellen 3.1.2 und 3.1.3 geht hervor, daß lediglich ein schwacher Jk^a-Ak gegen heterozygote Zellen mit Polybrene wie auch mit allen anderen Methoden keine Agglutination zeigte.

Die LISS- und Albumin-Medien zeigten zusätzlich Nachweisausfälle bei den Ak K̄ und Le^a; ein Anti-Jk^b ließ sich mit den verwendeten Albuminen nicht nachweisen.

Wie zu erwarten, kam es mit der Enzym-Technik insbesondere bei Lewis- und MNS-Ak zu keiner Reaktion.

Im weiteren sind wegen der Notwendigkeit, die Reaktionsstärken der insgesamt 798 Verdünnungsreihen über verschiedene Variationsfaktoren zu mitteln, die Ak-Titer durch die jeweiligen Punktsummen ersetzt worden.

Tab.3.1.2 Anteil der Testnegativen, bezogen auf die in einer Ak-Klasse insgesamt durchgeführten Nachweise mit dem jeweiligen Verstärkermedium.

LISS-Medien(L1-L4): DiaMed, Biotest, Dade, Ortho; ENZYM(EN): Papainlsg. von Molter

POLYKATIONEN-Medium(PB): Polybrene^R von Merz&Dade; ALBUMINE(A1-A4): DiaMed, Dade, Ortho, Molter

MEDIEN	ANTIKÖRPER															
	D	E	C ^w	K	k̄	Kp ^a	Fy ^a	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	H	S	s̄	P	Yt ^a
L1(AHG)	-	-	-	-	2(2)	-	-	1(2)	-	3(10)	-	-	-	-	-	-
L2 "	-	-	-	-	2(2)	-	-	1(2)	-	1(5)	-	-	-	-	-	-
L3 "	-	-	-	-	2(2)	-	-	1(2)	-	1(5)	-	-	-	-	-	-
L4 "	-	-	-	-	2(2)	-	-	1(2)	-	3(10)	-	-	-	-	-	-
EN(37°)	4(20)	-	-	13(20)	-	2(2)	20(20)	2(2)	2(2)	2(10)	-	2(2)	4(4)	4(4)	-	4(4)
En(AHG)	-	-	-	-	1(2)	-	20(20)	2(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
PB(20°)	-	-	-	-	-	-	-	1(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
PB(AHG)	-	-	-	-	1(2)	-	-	1(2)	-	4(10)	-	-	-	-	-	-
A1(AHG)	-	-	-	-	1(2)	-	-	2(2)	1(2)	4(10)	-	-	-	-	-	-
A2 "	-	-	-	-	1(2)	-	-	2(2)	2(2)	2(5)	-	-	-	-	-	-
A3 "	-	-	-	-	1(2)	-	-	1(2)	1(2)	2(5)	-	-	-	-	-	-
A4 "	-	-	-	-	1(2)	-	-	2(2)	2(2)	5(10)	-	-	-	-	-	-

Tab.3.1.3 Anteil der Verdünnungsreihen mit negativem Ergebnis im Verhältnis zur Gesamtzahl der jeweils mit einem Verstärkermedium durchgeführten Nachweisteste.

LISS-Medien(L1 -L4): DiaMed, Biotest, Dade, Ortho; ENZYM(EN): Papainlsg. von Molter

POLYKATIONEN-Medium(PB): Polybrene^R von Merz&Dade; ALBUMINE(A1 - A4): DiaMed, Dade, Ortho, Molter

o = alle Testansätze ohne Ausnahme positiv.

- = nicht mitgerechnet

Testversager bei den Methoden	Zahl negativer Nachweisteste bei Anti-															Summe negativer Teste	Gesamtzahl der Teste	Versagerquote in %	
	D	E	C ^w	K	K ^a	Kp ^a	Fy ^a	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	H	S	S̄	P				Yt ^a
L1 (AHG)	o	o	o	o	2	o	o	1	o	3	o	o	o	o	o	o	6	99	6,1
L2 "	o	o	o	o	2	o	o	1	o	1	o	o	o	o	o	o	4	56	7,1
L3 "	o	o	o	o	2	o	o	1	o	1	o	o	o	o	o	o	4	56	7,1
L4 "	o	o	o	o	2	o	o	1	o	3	o	o	o	o	o	o	6	99	6,1
LISS(L1 - L4):																	20	310	6,5
EN (37°)	4	o	o	13	o	2	-	2	2	2	o	2	4	4	o	4	39	79	49,4
EN (AHG)	o	o	o	o	1	o	-	2	o	o	o	o	o	o	o	o	3	79	3,8
PB (20°)	o	o	o	o	o	o	o	1	o	o	o	o	o	o	o	o	1	99	1,0
PB (AHG)	o	o	o	o	1	o	o	1	o	4	o	o	o	o	o	o	6	99	6,1
A1 (AHG)	o	o	o	o	1	o	o	2	1	4	o	o	o	o	o	o	8	99	8,1
A2 "	o	o	o	o	1	o	o	2	2	2	o	o	o	o	o	o	7	56	12,5
A3 "	o	o	o	o	1	o	o	1	1	2	o	o	o	o	o	o	5	56	8,9
A4 "	o	o	o	o	1	o	o	2	2	5	o	o	o	o	o	o	10	99	10,1
ALBUMIN(A1 - A4):																	30	310	9,7
METHODEN INSGESAMT (AHG)	o	o	o	o	14	o	o	14	6	25	o	o	o	o	o	o	59	798	7,4

3.2 Nachweisstärke der Polybrene-Technik(20°C) im Vergleich zu LISS(AHG), Enzym(37°C) und Albumin(AHG)

3.2.1 Punktsummenmittelwerte des untersuchten Ak-Spektrums

Vergleichsbasis war die Summe aller Agglutinationsscores einer geometrischen Ak-Verdünnungsreihe, die entweder gleich nach Testzellzusatz und Inkubation mit dem Vergleichsmedium oder erst nach dem abschließenden Antihumanglobulintest (bei LISS und Albumin) abgelesen wurden.

Für jede der 16 Ak-Spezifitäten wurden die Ergebnisse über die Zahl der Antikörper gleicher Spezifität und Ansatzvarianten gemittelt.

Für die Abb.3.2.1 wurden die vier LISS- und vier Albumin-Medien jeweils zu einem LISS- bzw. Albumin-Mittelwert zusammengefaßt.

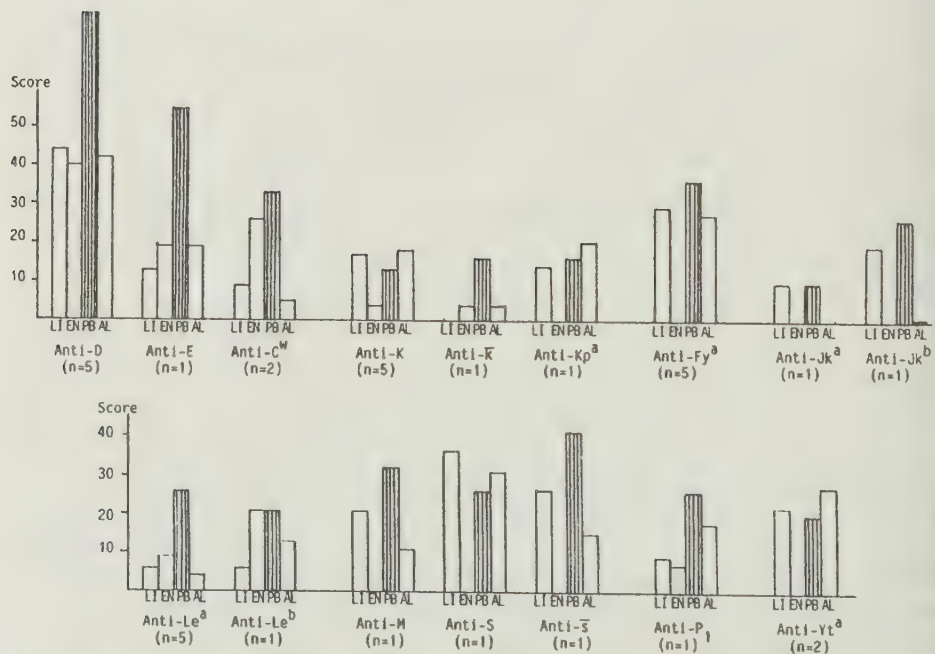


Abb.3.2.1 Punktsummenmittelwerte des untersuchten Antikörperspektrums.
LI=LISS(AHG) EN=ENZYM(37°) PB=POLYBRENE(20°) AL=ALBUMIN(AHG)

POLYBRENE(20°C) - dominierte bei 10 der 16 Ak-Spezifitäten als wirkungsvollstes Verstärkermedium. Insbesondere die Rhesusantikörper Anti-D und Anti-E, aber auch Anti-Le^a wurden mit dieser Nachweismethode anhand fast doppelt so starker Agglutinationsreaktionen wie bei den herkömmlichen Verfahren identifiziert.

Nachweise mit geringerer Agglutinationsstärke als sie die LISS-, enzym- oder albuminverstärkten Tests aufwiesen, traten bei den Kell-Antikörpern Anti-K und Anti-Kp^a, dem Kälteantikörper Anti-S und mit nur geringem Stärkeunterschied auch bei Anti-Yt^a auf.

LISS(AHG) - übertraf ALBUMIN(AHG) bei 9 der 16 Ak-Spezifitäten. Bei den beiden Kidd-Antikörpern gelang außer mit der Polybrene-technik n u r mit den LISS-Medien der Ak-Nachweis.

Bei den 5 Antikörpern der Anti-K-Gruppe erwiesen sich Liss und ALBUMIN als gleich stark und waren sowohl dem Enzym(37°C)- wie dem Polybrene(20°C)-Test überlegen.

Der ENZYM-Test ohne anschließende AHG-Zugabe - fiel bei allen Antikörpern der Spezifitäten Anti-Fy^a-MNSs sowie Anti-Jk^a und -Jk^b, aber auch bei Anti-Yt^a und Anti-Kp^a negativ, bei den übrigen Kell-Antikörpern nur relativ schwach aus.

Dagegen ergab der Enzymtest bei Rhesus- und Lewis-Ak(Le^b) Scorewerte, die mit den LISS/Albumin- bzw. Polybrene-Werten auf einer Stufe standen.

3.2.2 Entfernung der Polybrene-Scores vom Mittel aller Medien bei Anti-D, -K, -Fy^a und -Le^a

Bei den jeweils 5 Antikörpern der Spezifitäten D, K, Fy^a und Le^a wurde für jede Ansatzvariante die Häufigkeit der prozentualen Mittelwertsabweichung berechnet, bezogen auf einen mittleren Agglutinationsscore, der eine theoretische Wirkungsgleichheit der 10 verschiedenen Verstärkermedien ausdrückt.

Dabei ergab sich das in Abb. 3.2.2a - d dargestellte Verteilungsmuster der Abweichungshäufigkeit.

Die POLYBRENE-Werte zeigen bei den Spezifitäten Anti-D, -Fy^a und -Le^a neben einer größeren Streubreite Verteilungsschwerpunkte, die deutlich im Bereich positiver Mittelwertsabweichung vom Punkt der theoretischen Wirkungsgleichheit der vier Verstärkertypen lagen.

Bei Anti-K hingegen ergab sich eine Streuung der Abweichungshäufigkeit für Polybrene(20°C), die nicht über die der Enzym(37°C)-, Liss- oder Albumin-Technik hinausging. Positive Verteilungsschwerpunkte lagen jetzt bei Liss- und Albumin-Reagenzien.

3.3 Einfluß von Probenherkunft und Testzellwahl auf die Agglutinationsstärke

In den nächsten beiden Unterpunkten wurden die Werte der jeweils vier LISS- und Albuminmedien verschiedener Hersteller zu einem Mittelwert für die LISS(AHG)- bzw. ALBUMIN(AHG)-Gruppe zusammengefaßt.

3.3.1 Vergleich von Serum- und Plasma-Antikörperprobe

Von den insgesamt 34 Antikörpern konnten 26 Ak parallel aus Serum und Plasma bestimmt werden. Diese 26 Ak gehörten 9 verschiedenen Ak-Spezifitäten an.

Für sie und alle nur aus Serum bestimmten Spezifitäten wurden die erzielten Punktschwerpunkte, getrennt nach Verstärkertyp und Probenherkunft, über die Anzahl Ak pro Spezifität, Herstellervarianten und die verwendeten Testzellarten gemittelt.

Allerdings könnte bei einer solchen Mittelung der Einfluß der Testzellwahl unterschlagen werden, weshalb die orientierende Darstellung der globalen Mittelwerte im weiteren ergänzt werden soll.

Tabelle 3.3.1 zeigt zunächst diese Mittelwerte für die vier Verstärkertypen(Testphase jeweils in Klammern beigefügt).

Tab.3.3.1 Gerundete Mittelwerte der Punktsommen, die von den aus SERUM bzw. PLASMA stammenden Spezifitäten mit vier Verstärkertypen im Drei-Stufen-Test erzielt wurden.

Die Zahl von Ak pro Spezifität ist in Klammern gesetzt.

Verstärkertyp: Probenherkunft:		LISS(AHG)		ENZYM(37°)		POLYBRENE(20°)		ALBUMIN(AHG)	
		SER	PLA	SER	PLA	SER	PLA	SER	PLA
RHESUS	-D (5)	42	47	41	39	81	78	40	43
	-E (1)	13	-	19	-	55	-	19	-
	-C ^w (2)	9	-	26	-	33	-	5	-
KELL	-K (5)	17	17	4	4	12	13	21	15
	-k̄ (1)	0	-	4	-	16	-	4	-
	-Kp ^a (1)	15	12	0	0	21	10	22	18
DUFFY	-Fy ^a (5)	29	30	0	0	37	36	27	27
KIDD	-Jk ^a (1)	10	-	0	-	10	-	0	-
	-Jk ^b (1)	19	-	0	-	26	-	1	-
LEWIS	-Le ^a (5)	8	4	9	10	23	29	6	3
	-Le ^b (1)	9	4	21	21	16	25	18	9
MNS ⁺	-M (1)	21	-	0	-	32	-	11	-
	-S (1)	37	39	0	0	26	26	32	30
	-s̄ (1)	26	26	0	0	38	41	16	15
P	-P ₁ (1)	9	-	7	-	25	-	18	-
CARTWR.	-Yt ^a (2)	22	22	0	0	21	19	29	25

Die folgende Tabelle zeigt das Teilspektrum der 5 Ak-Klassen, deren Ak auch gegen homo- und heterozygote Testzellen getestet wurden. Die Mittelwerte der Tab.3.3.1 sind durch die Wertepaare (HOM/HET) ersetzt worden.

Tab.3.3.2 Gerundete Mittelwerte der Punktsommen(HOM/HET).

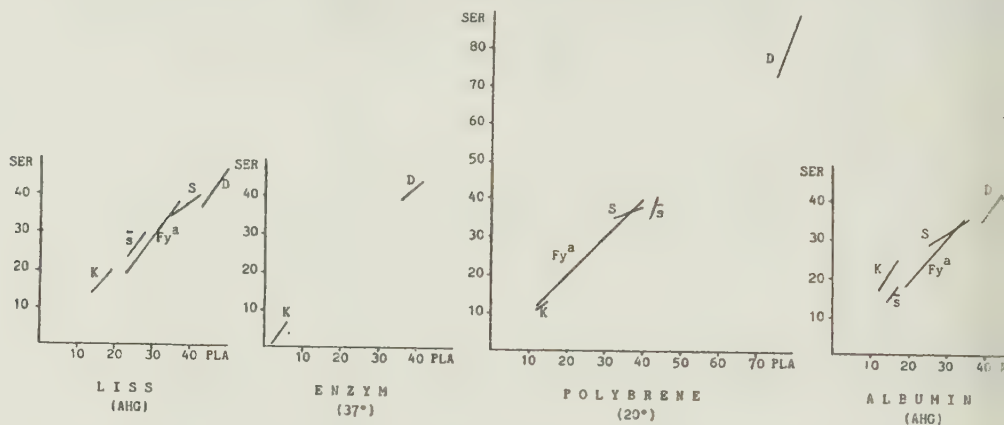
Anti-	LISS(AHG)		ENZYM(37°)		POLYBRENE(20°)		ALB(AHG)	
	SER	PLA	SER	PLA	SER	PLA	SER	PLA
-D (5)	47/37	50/43	44/39	42/36	89/73	81/75	46/35	47/39
-K (5)	20/14	19/14	7/1	6/2	13/11	15/12	25/17	17/12
-Fy ^a (5)	38/19	37/23	0/0	0/0	38/35	40/32	36/18	35/19
-S (1)	40/34	43/35	0/0	0/0	40/12	40/12	36/29	36/25
-s̄ (1)	30/23	28/23	0/0	0/0	41/35	44/42	18/14	17/14

Im Streudiagramm der Abb.3.3.1 liegen die Verbindungsstrecken der HOM(SER,PLA)- und HET(SER,PLA)-Werte in etwa parallel zur Winkelhalbierenden der SER/PLA-Diagramme.

Eine eventuelle Abhängigkeit der SER/PLA-Differenzen von der gewählten Testzellart besteht also nicht.

In Abb.3.3.2 sind die Punktsommen-Mittelwerte der 9 aus SERUM und PLASMA bestimmten Ak-Spezifitäten eingetragen.

Abb.3.3.1 Streudiagramm der Punktsommen-Mittelwerte von je 5 Anti-D, -K, -Fy^a und die Punktsommen der Einzelantikörper Anti-S und Anti- $\bar{S}$. Jeder Punkt wird in seiner Lage vom Scoresummenverhältnis der aus SERUM bzw. PLASMA stammenden Antikörper bestimmt, die mit 4 Typen von Verstärkermedien gegen 2 Testzellsorten untersucht wurden.



Die eingezeichneten Strecken verbinden die stets niedrigeren Werte der heterozygoten mit denen der homozygoten Zellen.

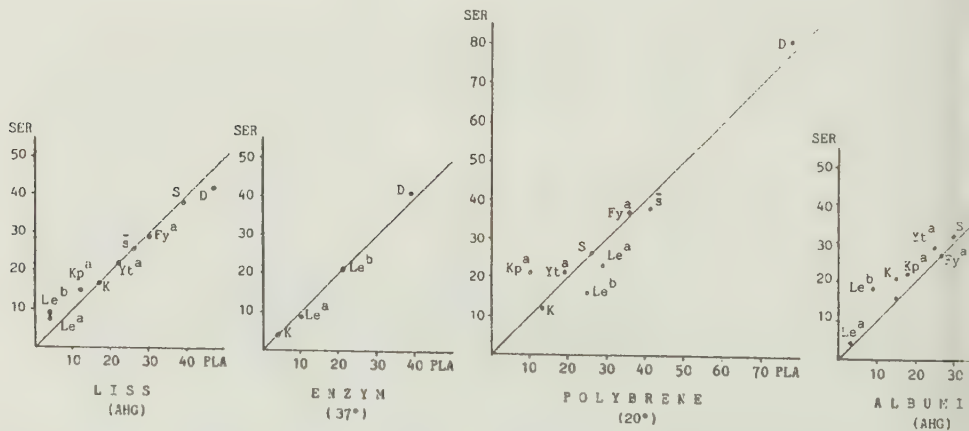


Abb.3.3.2 Streudiagramm der sowohl aus SERUM wie PLASMA untersuchten Antikörper. Die Punktsommen von Anti-D, -K, -Fy^a und Le^a sind jeweils über 5 Exemplare gemittelt. Bei Anti-D, -K, -Fy^a, -S und $\bar{S}$ wurden die Punktsommen der beiden Testzellarten gemittelt.

Aus der achsennahen Lage der SER/PLA-Koordinaten geht die W i r -
k u n g s g l e i c h h e i t von Serum- und Plasmaprobe bei den
Methoden LISS(AHG), ENZYM(37°C) und POLYBRENE(20°C) hervor.

Bei ALBUMIN(AHG) dagegen ist eine leichte Wirkungsverstärkung
durch die Verwendung der S e r u m p r o b e des Antikörpers zu
erkennen.

3.3.2 Vergleich von homo- und heterozygoten Testzellen

Analog zur vorletzten Abbildung wurden auch in Abb.3.3.3 die Wer-
tepaare der Tab.3.3.2 eingezeichnet, um einen eventuellen Einfluß
der Probenherkunft auf HOM/HET-Differenzen zu prüfen.

Serum- und Plasmawert der dargestellten Spezifitäten Anti-D, -K,
-Fy^a, -S und - $\bar{s}$ weisen eine kleine und regellose Streuung um den
gemeinsamen Mittelwert auf; ein Einfluß der Probenherkunft ist
also n i c h t anzunehmen.

Die folgende Tabelle 3.3.3 zeigt die Wertepaare (HOM/HET) der 5
n u r aus dem Serum bestimmten Ak-Spezifitäten.

Tab.3.3.3 Gerundete Mittelwerte der Punktsommen(HOM/HET).

Anti-		LISS(AHG)	ENZYM(37°)	POLYBRENE(20°)	ALB(AHG)
		SER	SER	SER	SER
-E	(1)	18/7	25/12	60/50	25/12
- $\bar{k}$	(1)	0/0	5/2	22/10	7/0
-Jk ^a	(1)	21/0	0/0	20/0	1/0
-Jk ^b	(1)	18/19	0/0	28/24	0/1
-M	(1)	30/12	0/0	43/21	17/6

Zusammen mit den Werten der aus Serum u n d Plasma bestimmten
Ak-Spezifitäten (Tab.3.3.2) sind diese Mittelwerte in das Streu-
diagramm der Abb.3.3.4 eingetragen worden.

Die Regressionsgeraden liegen bei allen vier Verstärkertypen
oberhalb der Linie einer theoretischen Wirkungsgleichheit von
h o m o - u n d h e t e r o z y g o t e r Testzellwahl.

Daraus erbibt sich bei den 10 untersuchten Ak-Spezifitäten eine
grundsätzliche Steigerung der Agglutinationsstärke durch die Ver-
wendung h o m o z y g o t vorliegender Antigenzellen.

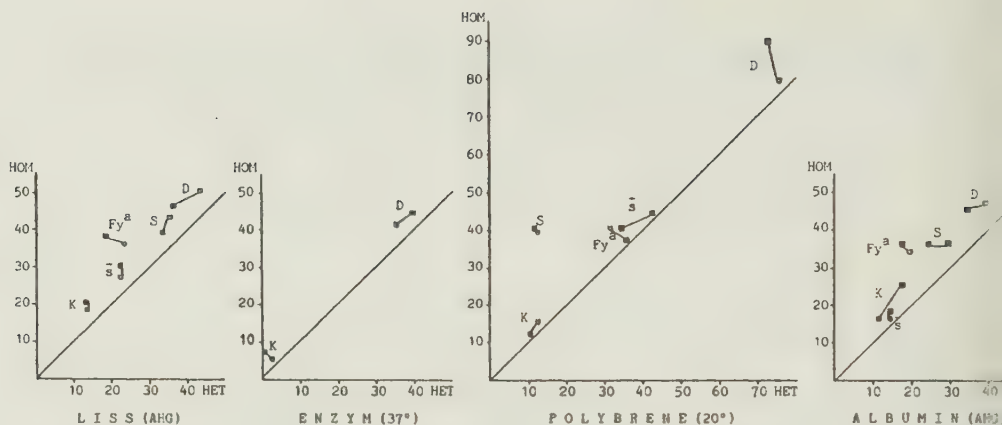


Abb. 3.3.3 Streudiagramm der sowohl gegen HOMOZYGOTE wie HETEROZYGOTE Testerythrozyten untersuchten Antikörper.

Die im Drei-Stufen-Test erzielten Punktschüme von Anti-D, -K und -Fy^a wurden jeweils über 5 Vertreter gemittelt. Linien verbinden in den vier Streudiagrammen jeweils das Resultat des Serumansatzes (■) mit dem des Plasmaansatzes (□); die Koordinaten der Markierungspunkte repräsentieren die HOM/HET-Wertepaare der Tabelle 3.3.2.

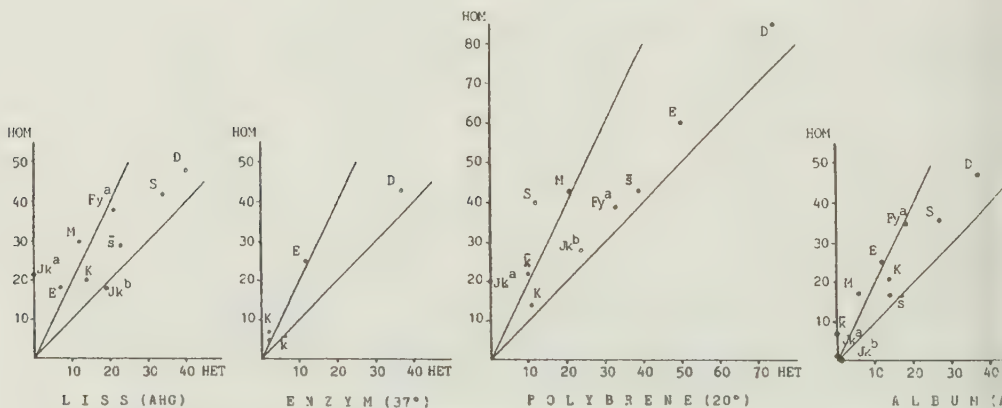


Abb. 3.3.4 Streudiagramm aller gegen HOMOZYGOTE und HETEROZYGOTE Testzellen untersuchten Antikörper. Die Punktschüme von Anti-D, -K und -Fy^a sind jeweils über 5 Exemplare gemittelt.

Mit Ausnahme der Ak Anti-Jk^a, -Jk^b, - $\bar{k}$, -E und -M, die nur aus dem Serum bestimmt wurden, ist bei Ak der Mittelwert aus Serum- und Plasmatest eingetragen.

Bei zwei Antikörpern - $\bar{k}$ und Jk^a - war mit heterozygoten Testzellen kein Nachweis mit einigen oder allen Nachweismethoden möglich: Anti- $\bar{k}$ konnte nur mit POLYBRENE(20°C) gegen eine heterozygote Testzelle nachgewiesen werden, während bei Anti- Jk^a für den heterozygoten Testfall alle Nachweisversuche fehlschlugen.

Die beiden folgenden Abbildungen 3.3.5 und 3.3.6 zeigen für alle 10 antigendifferent getesteten Ak-Spezifitäten die erreichten Agglutinationsscores.

Die Reduktion bei Heterozygoten macht im Mittel 31% der Punktwertsumme des Vollantigen-Tests aus.

Beim Anti-D-Nachweis sind die Unterschiede zwischen den Zellsorten relativ gering(Reduktion maximal 21%).

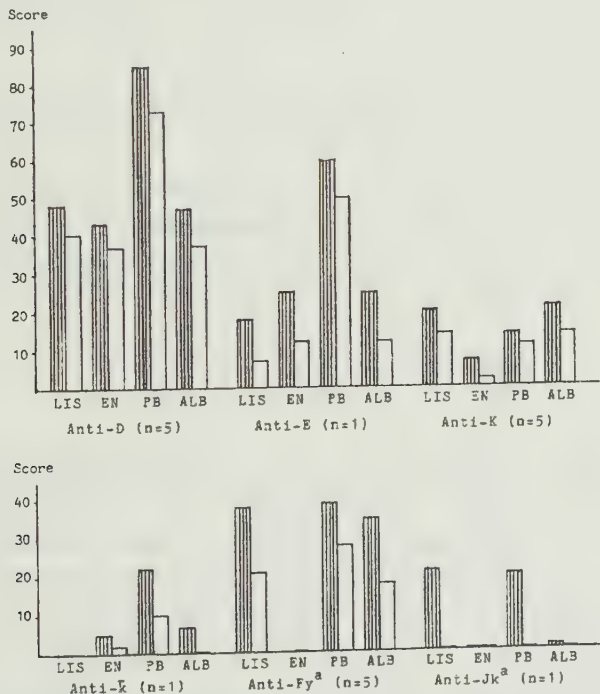


Abb.3.3.5 Mittelwerte der Punktwertsummen beim Ak-Test gegen:
 (■) HOMÖZYGOTE Testzellen (□) HETEROZYGOTE Testzellen
 LIS=LISS(AHG) EN=ENZYM(37°) PB=POLYBRENE(20°) ALB=ALBUMIN(AHG)
 Die Werte von Anti-D, -K und Fy^a sind Mittelwerte aus Serum- und
 Plasmaprobe.

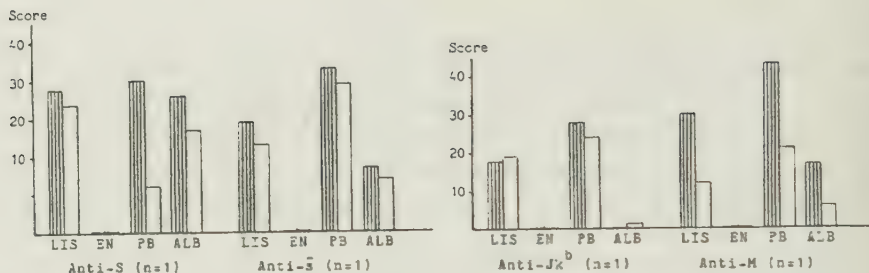


Abb.3.3.6 Mittelwerte der Punktwertsummen beim Ak-Test gegen:

(▨) HOMOZYGOTE Testzellen (□) HETEROZYGOTE Testzellen

LIS=LISS(AEG) EN=ENZYM(37°) PB=POLYBRENE(20°) ALB=ALBUMIN(AHG)

Die Werte von Anti-S und -S̄ sind Mittelwerte aus der Serum- und Plasmaprobe.

3.4 Agglutinationsstärke bei LISS- und ALBUMIN-MEDIEN verschiedener Hersteller

3.4.1 Vergleich der Summenscores von vier LISS-Reagenzien

Abb.3.4.1 zeigt für jede der 16 untersuchten Ak-Spezifitäten die über Proben- und Testzellart errechneten Mittelwerte der mit DIALISS von DiaMed (L1), MLB von Biotest (L2), ENLISST von Merz & Dade (L3) und REACTIN von Ortho Diagnostics erreichten Summenscores.

Zwischen den LISS-Medien-Mittelwerten ließen sich keine bedeutenden Unterschiede erkennen.

3.4.2 Vergleich der Summenscores von vier ALBUMIN-Reagenzien

Abb.3.4.2 zeigt für jede der 16 untersuchten Ak-Spezifitäten die über Proben- und Testzellart gemittelten Mittelwerte der mit den ALBUMIN-Lösungen von DiaMed (A1), Merz & Dade (A2), Ortho Diagnostics (A3) und Molter (A4) erzielten Summenscores.

Aus den Graphiken lassen sich keine relevanten Unterschiede in der Verstärkerwirkung der vier Albumine erkennen.

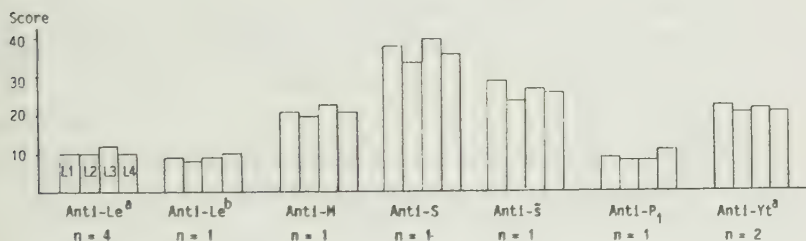
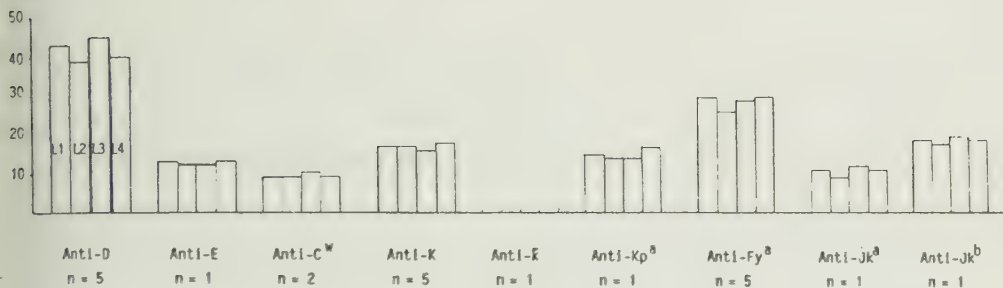
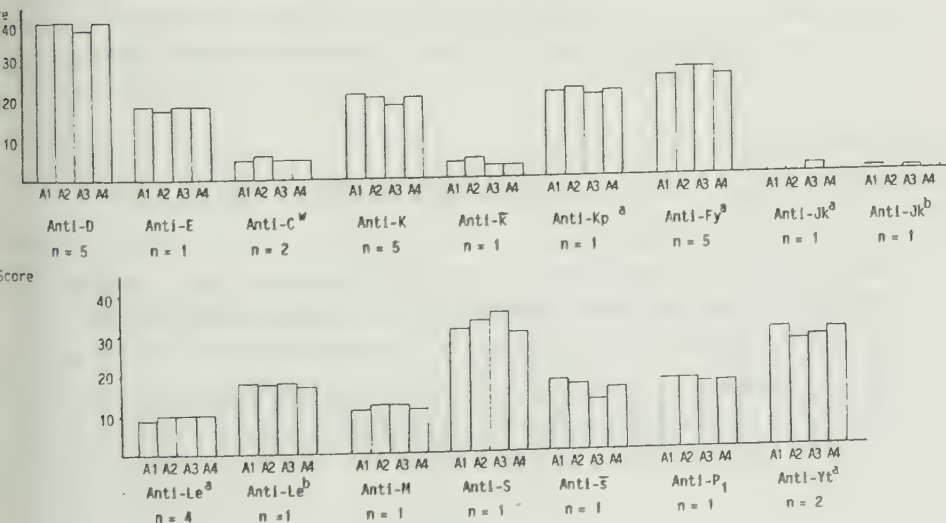


Abb. 3.4.1 Punktskizzen nach AHG-Zugabe von vier verschiedenen LISS-Reagenzien.

Alle Werte sind Mittelwerte über die jeweils verwendeten Proben- und Testzellarten.

Abb. 3.4.2 Punktskizzenvergleich der mit vier verschiedenen Rinderalbuminlösungen angesetzten Verdünnungsreihen nach AHG-Test. Über die bei den einzelnen Ak-Spezifitäten getesteten Proben- und Antigenarten wurde gemittelt.



3.5 Die untersuchten Ak-Spezifitäten im Überblick

3.5.1 Der POLYBRENE-Test bei verschiedenen Antikörper-Gruppen

Die RHESUS-Gruppe

Sie umfaßte 5 Anti-D-, einen Anti-E- sowie 2 Anti-C^W-Antikörper (s. Tab.3.5.1a).

Der POLYBRENE-Test(20°C) weist in dieser Gruppe die insgesamt höchsten Summenscores auf; dies gilt sowohl den anderen Gruppen gegenüber als auch im Vergleich zur eigenen AHG-Phase.

Bei Anti-D und -E ist der Polybrene-Test(20°C) auch gegenüber den parallel getesteten Nachweistechiken - LISS(AHG), ENZYM(37°) und ALBUMIN(AHG) - von doppelter Nachweisstärke.

Die KELL-Gruppe

Sie umfaßte 5 Anti-K-, einen Anti-k̄- sowie einen Anti-Kp^a-Antikörper (s. Tab.3.5.1b)

Beim Test auf Anti-k̄ gegen eine heterozygote Testzelle war POLYBRENE(20°C) die einzige Technik und Phase, bei der ein deutlicher Ak-Nachweis geführt werden konnte.

Allerdings wurden die KELL-Antikörper bei mehr als der Hälfte der Fälle mit einem zusätzlichen AHG-Test (sicherer)besser nachgewiesen als mit dem POLYBRENE-Test(20°) allein.

Die DUFFY-Gruppe

Sie bestand aus 5 Anti-Fy^a-Antikörpern (s. Tab.3.5.1c).

Im Gegensatz zu den untersuchten Antikörpern des MNS-Systems erwies sich beim ENZYM-Test die Inaktivierung der Rezeptoren durch das proteolytische Ferment als so vollständig, daß es bei 37°C und in der AHG-Phase zum totalen Nachweisausfall kam.

Der POLYBRENE-Test übertraf LISS(AHG) und ALBUMIN(AHG) auch bei heterozygoter Testzellverwendung eindeutig.

Die KIDD-Gruppe

Untersucht wurde je ein Antikörper gegen die komplementären Antigene Jk^a und Jk^b (s. Tab.3.5.1c).

Dabei zeigte sich eine starke Überlegenheit der LISS- gegenüber den Albumin-Reagenzien.

Der POLYBRENE-Test(20°C) war den LISS-Reagenzien gleichwertig oder sogar überlegen (bei Anti- Jk^b), wogegen ein Nachweis von Anti- Jk^a mit heterozygoten Testzellen weder mit dem Polybrene- noch mit einem anderen Verstärker-Medium gelang.

Die LEWIS-Gruppe

Sie umfaßte 5 Le^a und einen Le^b -Antikörper (s. Tab.3.5.1d).

Aus einem Vergleich der Punktsommen der Raumtemperatur- und AHG-Phase ergeben sich Hinweise auf eine Spaltung der Le^a -Antikörper-Gruppe in natürliche, komplette Kälteantikörper - Anti- Le^a (2) und - Le^a (3) - und inkomplette Immunantikörper - Anti- Le^a (4).

Bei Anti- Le^a (1,5) fielen die Reaktionen zu schwach und uneinheitlich aus, um Zuordnungen treffen zu können.

Der Enzym-Test(37°C) hatte höhere Punktsommenmittelwerte als LISS(AHG) und Albumin(AHG).

Der POLYBRENE-Test(20°C) wies bei Anti- Le^a durchschnittlich doppelt so hohe, bei Anti- Le^b gleich hohe Scoresummenwerte auf wie der Enzym(37°C)-Test.

Die MNSs-Gruppe

Sie bestand aus je einem Anti-M-, Anti-S- und Anti- $\bar{s}$ -Antikörper (s. Tab.3.5.1e).

Bei allen Vertretern dieser Gruppe zeigte sich im Enzym-Test bei 37°C k e i n e Agglutination, während nach anschließender AHG-Zugabe ein Ak-Nachweis möglich war.

Der Dosiseffekt(50%ige Scorereduktion bei heterozygoter Testzelle) prägte sich nur beim Anti-M-Antikörper voll aus.

Der POLYBRENE-Test(20°C) zeigte bei Anti-M und Anti- $\bar{S}$ die höchsten Punktsommen.

Das P-System

Es wurde ein Anti-P₁ getestet (s. Tab.3.5.1e).

Dieser Antikörper zeigte bei Raumtemperatur die stärksten Reaktionen, wie es von einem meist natürlich vorgebildeten Kälteagglutinin erwartet werden kann.

Bei Raumtemperatur reagierten die ALBUMINE am stärksten.

Der POLYBRENE-Test(20°C) reagierte fast ebenso stark und war den übrigen Verstärkermedien in den verglichenen Phasen überlegen.

Aus der Gruppe seltener Antikörper: CARTWRIGHT

Es wurden zwei Anti-Yt^a-Antikörper untersucht (s. Tab.3.5.1e).

Die höchsten Scorewerte fanden sich bei den ALBUMIN(AHG)-Testen.

Der POLYBRENE(20°C)-Test fiel wie der LISS-Test(AHG) etwas schwächer aus, während mit Enzym(37°C) bei keiner Ansatzvariante ein Nachweis möglich war.

3.5.2 Tabellarische Übersicht: die Punktsommenscores aller angesetzten Verdünnungsreihen im Drei-Stufen-Test

Dargestellt wurden in horizontaler Reihung die Variationen in Probenherkunft(Serum oder Plasma), verwendeter Testzelle(homozygot oder heterozygot) und das angewandte Verstärkerreagenz(L1-A4); vertikal sind die untersuchten Antikörper in 8 Gruppen aufgeführt.

Nach dem Auswertungsschema des benützten Drei-Stufen-Tests im Zentrifugierröhrchen tauchen für jede der maximal 32 Verdünnungsreihen pro Antikörper die Agglutinationssummenscores der drei Phasen - (20°C - 37°C - AHG) - als Zahlentripel auf.

Übersprungene Phasen eines Ansatzes sind mit Bindestrich markiert.

TABELLE 3.5.1a Punktsummscores der Verdünnungsreihen im Drei-Stufen-Test

Serum	S E R U M																P L A S M A																
	Antigen homozygot								Antigen heterozygot								Ag. homozygot								Ag. heterozygot								
	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	
ESUS																																	
ti-D(1)	20°	0	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	56	0	0	0	0	0	0	0	51	0	0	0	0	61	0	0		
	37°	0	0	0	0	-	13	6	6	6	0	0	0	0	0	-	13	5	5	5	0	0	0	-	6	7	0	0	-	5	6		
	AKG	26	18	26	13	13	41	21	30	21	19	13	11	11	11	13	45	14	11	11	13	21	26	11	33	13	18	26	11	11	40	11	13
ti-D(2)	20°	0	0	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	0	0	0	0	0	0	0	63	0	0	0	0	57	0	0		
	37°	0	0	0	0	27	-	26	13	6	6	0	0	0	0	27	-	13	5	5	0	0	27	-	33	15	0	0	27	-	0	12	
	AKG	40	43	51	45	36	46	51	45	40	45	31	28	39	45	42	53	36	40	26	45	45	46	35	56	51	51	43	38	35	47	44	35
ti-D(3)	20°	0	0	0	0	86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	81	0	0	0	0	0	0	0	87	0	0	0	0	80	0	0		
	37°	0	0	0	0	43	-	32	27	25	24	0	0	0	0	37	-	22	21	7	15	0	0	44	-	21	21	0	0	40	-	35	26
	AKG	33	27	39	24	33	53	25	25	25	25	33	20	30	25	27	48	30	23	30	32	32	29	33	54	33	35	37	39	45	37	32	
ti-D(4)	20°	12	12	12	12	127	12	12	12	12	3	3	3	3	53	3	3	3	3	25	24	117	25	27	8	7	99	7	7				
	37°	45	43	57	47	71	-	45	42	39	41	23	33	38	27	52	-	39	35	27	30	49	44	69	-	57	52	17	19	52	-	40	30
	AKG	82	82	82	74	63	87	75	80	74	78	64	56	57	56	50	73	49	47	45	47	79	83	69	76	70	72	57	68	54	67	50	51
ti-D(5)	20°	0	0	0	0	102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	76	0	0		
	37°	0	0	0	0	77	-	69	61	52	51	0	0	0	0	77	-	56	51	55	55	0	0	68	-	65	56	0	0	62	-	61	42
	AKG	56	57	59	62	74	58	63	54	60	57	53	51	51	49	60	53	47	53	53	48	63	71	67	66	66	72	59	60	60	61	58	
ti-E	20°	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	76	0	0		
	37°	8	9	8	25	-	14	15	15	15	0	0	0	0	12	-	7	6	7	8	12	13	11	12									
	AKG	19	18	17	18	30	28	25	23	26	26	7	6	7	8	18	24	12	13	11	12												
ti-C ⁽¹⁾	20°	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	76	0	0		
	37°	23	22	25	26	27	-	18	16	18	19																						
	AKG	10	10	11	10	21	30	6	7	6	6																						
ti-C ⁽²⁾	20°	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	89	0	0	0	0	76	0	0		
	37°	15	16	14	15	25	-	12	12	11	11																						
	AKG	8	8	8	7	21	40	4	5	4	3																						
TESTMEDIE:	DIALISS, L1	MLB, L2	ENLISST, L3	REACTIN, L4		PAPAIN, EK		POLYBRENE, PB		ALBUMIN von DiaMed, A1	Merz&Dade, A2	Ortho, A3	Molter, A4																				

TABELLE 3.5.1b Punktsummscores der Verdünnungsreihen KELL-Antikörperhaltiger Blutproben im Drei-Stufen-Test

Robenart:		S E R U M																P L A S M A																
testzellen		Antigen homozygot								Antigen heterozygot								Ag. homozygot								Ag. heterozygot								
TESTMEDIE		L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	
ELL																																		
Int-I-K(1)	20°	0	0	0	0		19	0	0	0	0	0	0	0	0		12	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0		12	0	0	
	37°	0	0	0	0	18	-	12	0	0	0	0	0	0	0	5	-	3	0	0	0	2	2	19	-	12	7	2	2	3	-	12	3	
	AKG	15	15	14	15	24	18	23	16	16	18	8	8	6	8	9	11	15	12	14	11	21	15	19	14	15	14	18	9	8	7	9	7	
Int-I-K(2)	20°	0	0	0	0		5	0	0	0	0	0	0	0	0		17	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0		7	0	0		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	
	AKG	12	7	7	12	10	13	14	18	17	21	12	7	9	7	3	12	12	16	14	20	18	18	5	18	12	15	12	12	3	9	7	12	
Int-I-K(3)	20°	0	0	0	0		3	0	0	0	0	0	0	0	0		9	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0		19	0	0		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	
	AKG	33	25	30	30	29	12	34	25	25	27	21	22	24	25	20	22	21	22	20	18	16	14	18	14	19	22	18	25	22	25	16	18	
Int-I-K(4)	20°	0	0	0	0		18	0	0	0	0	0	0	0	0		9	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	0		11	0	0		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	
	AKG	28	28	24	25	30	18	33	36	38	37	15	25	18	28	21	10	25	25	18	17	25	18	27	19	15	14	9	25	13	12	12		
Int-I-K(5)	20°	0	0	0	0		21	0	0	0	0	0	0	0	0		9	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0		9	0	0		
	37°	0	0	0	0	18	-	20	21	14	12	0	0	0	0	0	-	8	14	10	12	0	0	11	-	20	18	0	0	8	-	14	12	
	AKG	18	22	22	18	24	18	25	25	20	22	8	10	8	7	10	12	18	16	12	18	21	25	14	18	21	26	12	12	9	12	16	14	
Anti-K	20°	0	0	0	0		22	0	0	0	0	0	0	0	0		10	0	0	0	0	0												
	37°	0	0	0	0	5	-	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-	0	0	0	0	0												
	AKG	0	0	0	0	15	12	7	9	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
Anti-Kp ^B	20°											0	0	0	0		21	0	0	0	0	0						0	0	0	10	0	0	
	37°											0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0						0	0	0	-	0	0	
	AKG											15	14	14	17	21	11	22	23	21	22							12	12	13	7	18	17	
TESTMEDIE:	DIALISS, 1.1	MLB, L2	ENLISST, L3	REACTIN, L4		PAPAIN, EK		POLYBRENE, PB		ALBUMIN von DiaMed, A1	Merz&Dade, A2	Ortho, A3	Molter, A4																					

TABELLE 3.5.1c Punktsummscores von Verdünnungsreihen mit DUFFY- und KIDD-Antikörpern im Drei-Stufen-Test

Probenart	S E R U M																				P L A S M A											
Testzellen	Antigen homozygot										Antigen heterozygot										Ag. homozygot						Ag. heterozygot					
TESTMEDIE	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	L1	L4	EN	PB		
DUFFY																																
Anti-Fy ^a (1)	20°	0	0	0	0		11	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0		11	0	0	0	0	0	10		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	
	AHG	18	13	12	15	0	9	18	18	21	14	15	10	12	14	0	7	14	18	18	14	15	10	0	9	18	12	14	13	0	8	
Anti-Fy ^b (2)	20°	0	0	0	0		27	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0		41	0	0	0	0	0	29		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	
	AHG	25	18	25	25	0	29	7	11	12	11	12	12	18	13	0	23	7	7	7	7	25	22	0	35	18	18	22	18	0	25	
Anti-Fy ^c (3)	20°	0	0	0	0		27	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0		30	0	0	0	0	0	28		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	
	AHG	25	25	25	25	0	22	30	30	32	25	29	24	31	31	0	18	26	28	30	32	32	31	0	31	29	30	33	33	0	30	
Anti-Fy ^d (4)	20°	0	0	0	0		27	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	0		12	0	0	0	0	0	11		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	
	AHG	12	8	10	16	0	16	12	15	9	11	9	4	5	8	0	4	6	7	7	7	12	12	0	10	12	16	8	7	0	8	
Anti-Fy ^e (5)	20°	0	0	0	0		98	0	0	0	0	0	0	0	0	77	0	0	0	0	0	0		108	0	0	0	0	0	81		
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	
	AHG	121	112	113	115	0	93	105	114	111	110	36	33	36	33	0	32	30	30	36	33	109	102	0	92	97	100	42	38	0	37	
KIDD																																
Anti-Jk ^a	20°	0	0	0	0		20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0										
	AHG	21	17	23	22	0	12	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
Anti-Jk ^b	20°	0	0	0	0		28	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0											
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0										
	AHG	18	18	19	17	16	11	0	0	0	0	19	17	20	20	16	10	2	0	2	0											
TESTMEDIE	DIALISS, MLB, ENLISST, REACTIN * PAPAIN * POLYBRENE * ALBUMIN von DiaMed, Herz&Dade, Ortho, Mol																															
	L1 L2 L3 L4 EN PB A1 A2 A3 A4 L1 L2 L3 L4 EN PB A1 A2 A3 A4 L1 L4 EN PB A1 A4 L1 L4 EN PB																															

TABELLE 3.5.1d Punktsummscores von Verdünnungsreihen mit LEWIS-Antikörpern im Drei-Stufen-Agglutinationstest

Probenart	S E R U M																				P L A S M A											
Testzellen	Antigen homozygot										Antigen heterozygot										Ag. homozygot						Ag. heterozygot					
TESTMEDIE	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	L1	L4	EN	PB		
LEWIS																																
Anti-Le ^a (1)	20°											0	0	0	0		38	5	5	5	5											
	37°											0	0	0	0	0	-	0	0	0	0											
	AHG											0	0	0	0	21	0	0	0	0	0											
Anti-Le ^b (2)	20°											16	21	21	18		18	18	18	18	18											
	37°											0	0	2	0	13	-	18	18	8	13											
	AHG											11	11	13	9	14	0	12	9	9	9											
Anti-Le ^c (3)	20°											7	7	7	7		18	18	16	18	14											
	37°											0	0	0	0	18	-	13	12	14	14											
	AHG											12	12	12	12	18	12	7	12	12	12											
Anti-Le ^d (4)	20°											0	0	0	0		30	0	0	0	0											
	37°											0	0	0	0	9	-	11	11	3	5											
	AHG											9	9	13	12	25	25	8	8	10	9											
Anti-Le ^e (5)	20°											0	0	0	0		9	5	0	0	0											
	37°											0	0	0	0	5	-	8	3	0	0											
	AHG											8	8	8	8	18	3	0	0	0	0											
Anti-Le ^f	20°											9	9	8	8		16	14	14	11	15											
	37°											0	0	0	0	21	-	7	7	6	7											
	AHG											9	8	9	10	18	5	18	18	18	17											
TESTMEDIE	DIALISS, MLB, ENLISST, REACTIN	L1	L2	L3	L4							PAPAIN					POLYBRENE							ALBUMIN von DiaMed, Herz&Dade, Ortho, Mol								
												EN					PB							A1	A2	A3	A4					

ABELLE 3.5.1e Agglutinationssummenscores von Verdünnungsreihen mit Antikörpern des MNS-, P- und CARTWRIGHT-Systems

Probenart	S E R U M																P L A S M A																
Testzellen	Antigen homozygot								Antigen heterozygot								Ag. homozygot								Ag. heterozygot								
TESTMEDIENT	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L2	L3	L4	EN	PB	A1	A2	A3	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	L1	L4	EN	PB	A1	A4	
INS ^s																																	
Anti-M	20°	34	30	28	30	-	43	24	26	24	22	16	12	11	12	-	21	10	9	8	8												
	37°	30	31	30	30	0	-	16	17	17	14	12	12	12	12	0	-	6	7	6	5												
	AHG	30	28	32	30	9	20	17	18	17	16	12	11	13	12	5	9	5	6	6	6												
Anti-S	20°	0	0	0	0	-	40	0	0	0	0	0	0	0	0	-	12	0	0	0	0	0	0	-	40	0	0	0	0	-	12	0	0
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0
	AHG	30	39	43	39	28	50	34	37	37	34	37	29	36	32	19	39	28	28	33	25	45	41	24	58	35	37	36	34	22	43	24	25
Anti- $\bar{S}$	20°	0	0	0	0	-	41	0	0	0	0	0	0	0	0	-	35	0	0	0	0	0	0	-	44	0	0	0	0	-	42	0	0
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0
	AHG	31	27	30	30	16	27	20	20	15	15	26	21	23	22	10	23	15	13	10	16	29	27	17	35	18	15	26	20	10	25	11	16
P-System																																	
Anti-P ₁	20°	19	21	17	19	-	26	28	28	27	26																						
	37°	0	0	0	0	7	-	13	11	13	13																						
	AHG	9	8	8	11	12	20	18	18	17	17																						
CARTWRIGHT																																	
Anti-Yt ^a (1)	0	0	0	0	0	-	24	0	0	0	0							0	0	-	24	0	0										
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0							0	0	0	-	0	0										
	AHG	26	24	25	24	24	19	31	26	32	30							25	27	29	27	25	23										
Anti-Yt ^a (2)	0	0	0	0	0	-	18	0	0	0	0							0	0	-	13	0	0										
	37°	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0							0	0	0	-	0	0										
	AHG	19	18	19	18	25	18	29	28	23	30							21	13	18	13	25	25										
TESTMEDIENT:	DIALISS,	MLB,	ENLIST,	REACTIN	*	PAPAIN	*	POLYBRENE	*	ALBUMIN von	DiaMed,	Merz&Dade,	Ortho,	Molter																			
	L1	L2	L3	L4		EN		PB			A1	A2	A3	A4																			

3.6 Statistische Tests

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest als verteilungsfreies Analogon zum t-Test für paarige Meßwerte wurde für den SERUM/PLASMA- und den HOMOZYGOTEN/HETEROZYGOTEN-Vergleich berechnet.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für das untersuchte Ak-Spektrum.

Tab.1 Wilcoxon-Paardifferenzentest für paarige Meßwerte

Vergleichspaar	bei L1(AHG)	L4(AHG)	PB(20°)	A1(AHG)	A4(AHG)
SER(HO)-PLA(HO)	n.s. ¹⁾	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SER(HE)-PLA(HE)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HOM(SE)-HET(SE)	32/7 ²⁾	37/19	n.s.	37/7	27/20
HOM(PL)-HET(PL)	23/22,5	n.s.	n.s.	23/5	23/7

¹⁾ n.s. = nicht signifikant unterschiedlich auf dem 1%-Niveau bei zweiseitiger Fragestellung.

²⁾ X_P/RSV = Kritische Oberschranke(KP), unter der die Rangsumme des selteneren Vorzeichens(RSV) liegen muß, um auf dem angenommenen Niveau für die Irrtumswahrscheinlichkeit einen signifikanten Unterschied annehmen zu können.

Die Abhängigkeit des Aggl.ergebnisses von der verwendeten Testsuchzelle kann bei POLYBRENE(20°) als geringer eingeschätzt werden.

4. D i s k u s s i o n

4.1 Der neue Aggregationsvermittler POLYBRENE

4.1.1 Die Zuverlässigkeit

Bei den von uns untersuchten 34 Antikörpern zeigte der neue Agglutinationsverstärker auf Polykationenbasis bereits in der Raumtemperaturphase ungewöhnlich hohe Quoten positiver, meist hochtitriger Agglutinationen.

Polybrene konnte sogar in einem Fall - bei einem Antikörper der Spezifität Anti- $\bar{k}$ - als e i n z i g e Testmethode einen sicheren Ak-Nachweis erbringen.

Zusätzlich ließ sich ein Anti-Jk^a allein mit der Polybrene-Methode nachweisen - allerdings nur mit homozygoten Testzellen - während der Nachweis bei allen anderen Medien weder mit homo- noch heterozygoten Zellen gelang.

Da im Routinescreening bei der Ak-Suche nicht für alle in Frage kommenden Ak homozygote Testzellen verwendet werden können, schafft der zusätzliche Polybrene-Ansatz eine erhöhte Nachweissicherheit.

Mit einer Versagerquote von 1% erweist sich die Polybrene(20°C)-Technik im Vergleich zu Liss(AHG)-, Enzym(37°C)- und Albumin-(AHG)-Test als die Nachweismethode mit der höchsten Sensitivität.

Aber nicht nur die Nachweisbarkeit überhaupt, sondern auch die Agglutinationsstärke und die Titerhöhe der positiven Agglutinationen sind für die Qualität eines Ak-Tests bedeutsam.

So konnten wir die überdurchschnittlich hohen Titer und Scoresummen, die mit der manuellen Polybrene(20°C)-Technik vor allem bei Rh-Ak auch von anderen Untersuchern(9) erzielt worden waren, bestätigen.

Die bekannte Schwäche des Agglutinationsergebnisses beim Anti-K-Nachweis trat auch in unserer Testreihe(n=5) auf(12); es kam jedoch bei insgesamt 20 Verdünnungsreihen zu keinem Nachweisversagen der Polybrene-Technik(20°C).

Da bei unseren Kell-Antikörpern im Gegensatz zu den meisten anderen Antikörpern die AHG-Phasen des POLYBRENE-Testes stärker ausfielen als die 20°C-Phasen, sollte (wie auch vom Hersteller empfohlen) der Polybrene(20°C)-Test mit einem nachfolgenden AHG-Test kombiniert werden.

4.1.2 Zeitvorteil

Der Zeitfaktor spielt in der Situation eines klinischen Routine-labors mit einer hohen Zahl hämatologischer und chirurgischer Notfälle eine große Rolle. Während die bisher zur Verfügung stehenden Techniken(LISS: 20-30 Min und ALBUMIN: 45-60 Min) bei der Kreuzprobe und beim Ak-Suchtest im Zentrifugierröhrchen zu einer erheblichen Zeitverzögerung, besonders in Notfallsituationen, geführt haben, ist mit der Polybrene-Technik(20°C-Ansatz allein: 3-5 Min) eine Transfusion nahezu ohne Zeitverzögerung möglich.

Die im Anschluß an den Polybrene-Test (bei 20°C) empfohlene AHG-Zugabe, durch die sich die Durchführung der Methode auf insgesamt 10-15 Min verlängert, erbringt nur in seltenen Fällen eine zusätzliche positive Reaktion, so daß in der Regel bereits nach 5 Min eine Transfusion mit hoher Sicherheit für den Patienten durchgeführt werden kann.

4.1.3 Einschränkungen der Validität beim quantitativen Testfall

Die potenzierte Agglutinationsstärke bei der Polybrenetechnik(20°C) kann bei quantitativen Untersuchungen eine Schattenseite zeigen: das Scoreresultat beruht auf der Summenbildung aller positiven Punktwerte einer geometrischen Verdünnungsreihe, deren Einzelscores zunächst schnell abnehmen, um dann in einem Übergangsfeld niedrigwertiger Verdünnungsstufen auf Null zu sinken.

Aus dieser Scoreverteilung läßt sich die beobachtete große Streubreite der POLYBRENE(20°C)-Werte bei der statistischen Beschrei-

bung und Analyse herleiten, die im Kontrast zu den Vergleichsmethoden LISS und ALBUMIN steht.

Von daher sind kritische LITERANGABEN, wie sie auf der Grundlage der Standardmethoden für den quantitativen Blutgruppen-Antikörpernachweis in die Literatur eingegangen sind, nicht voll auf die Ergebnisse des POLYBRENE-Testes übertragbar.

4.2 Einfluß von Serum- bzw. Plasmalösung der Antikörper auf das Agglutinationsverhalten im Drei-Stufen-Test

Serum und Plasma zeigen in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung zwei Momente, die für die Agglutination im Ak-Test von Bedeutung sein können: der höhere Gehalt an Makromolekülen sowie die Ca^{++} -Bindung im EDTA-stabilisierten Plasma.

Ein Einfluß des Makromolekülgehalts hat sich nach unseren Erfahrungen nur beim ALBUMIN(AHG)-Test in leichter Form gezeigt. Bis auf die fünf Anti-D-Antikörper agglutinieren von 26 Antikörpern 21 stärker(=16) oder gleich stark(=5) im Serum.

Vermutlich begrenzt der auf die gängige Verwendung von Serumproben abgestimmte Gehalt der ALBUMIN-Lösungen an makromolekularem Rinderalbumin(30%) die agglutinationsfördernde Wirkung des ALBUMIN-Reagens im Plasma.

Da die übrigen Vergleichsmethoden - LISS, ENZYM, POLYBRENE - anderen Verstärkungsprinzipien folgen, überrascht die Wirkungs-gleichheit von Serum und Plasma bei ihnen nicht.

Die Ca^{++} -Bindung im Plasma(EDTA) könnte bei bestimmten Antikörpergruppen, zum Beispiel DUFFY und KIDD, bei denen es einen meist geringen Prozentsatz komplementbindender Antikörpervarianten gibt, wegen der Blockierung des Komplement-Coaktivierungs-Faktors Ca^{++} zu Nachweisdefiziten im AHG-Test führen (1).

Nachdem in unserem Erfahrungsbereich kein komplementabhängiger Antikörper nachgewiesen werden konnte, ist ein Blick auf die

Rolle, die der POLYBRENE(20°)-Test in diesem Zusammenhang spielt, nur von theoretischem Interesse.

So könnte eine unzulängliche antikomplementäre Wirksamkeit von AHG-Reagenzien, wie sie von GARRATTY(15) und ISSITT(23) festgestellt wurde, durch die Verwendung der POLYBRENE(20°C)-Technik umgangen werden, die bei uns - außer bei Anti-K - zumeist höhere Summenscores als die AHG-Phasen der Vergleichsmethoden erbrachte.

4.3. Einfluß der Gendosis von Indikatorzellen im Drei-Stufen-Test

Im Rahmen unserer Untersuchungen sahen wir nur bei MNSs- und DUFFY-Antikörpern ein etwa doppelt so starkes Agglutinationsergebnis bei Verwendung der jeweils h o m o z y g o t e n Testzelle, d. h. den erwarteten Dosiseffekt.

Andererseits geschah es nur in einem Fall eines Anti-Jk^a, daß die verwendete h e t e r o z y g o t e Testzelle nicht nur schwächer reagierte, sondern auf keine Weise einen Ak-Nachweis erlaubte.

Aus diesen Beobachtungen läßt sich für die Antikörpersuch- und differenzierungsteste, die mit einem Panel verschiedener Indikatorzellen arbeiten, eine Verwendung antigenreduzierter Indikatorzellen bei einer Verminderung der Heterozygotenwerte um durchschnittlich 31% gegenüber den Titerscorewerten der homozygoten Zellen rechtfertigen, zumal es in der Praxis überhaupt nicht durchführbar ist, homozygote Testsuchzellen über das RHESUS- und KELL-System hinaus für das Routinescreening zu verwenden.

4.4. Wirkungsvergleich von LISS- und ALBUMIN-Reagenzien

Zumindest im Rahmen der von uns untersuchten Spezifitäten waren die verwendeten LISS bzw. Albuminmedien verschiedener Hersteller untereinander im Agglutinationsergebnis gleichwertig.

Die Frage stellt sich, ob nicht lediglich praktische Fragen wie die Benutzerfreundlichkeit, die Stabilität und Dosierbarkeit der Lösungen relevante Kriterien für eine kritische Auswahl bieten sollten.

4.5 Notwendige Vielfalt der Verstärkermethoden

Im Verlauf unserer Antikörpertesting ergaben sich immer wieder Konstellationen von gelungenen und insuffizienten Methoden des Antikörpernachweises, die erst in der Kombination mehrerer Untersuchungsprinzipien den "blinden Fleck" jedes einzelnen Nachweisverfahrens kompensieren konnten.

Diese gegenseitige Kontrollmöglichkeit zeigt bei paralleler Verwendung hohe Sicherheitsreserven.

Im Spannungsfeld zwischen möglichst hoher Sensitivität und ausreichender Spezifität bestimmt aber auch der Rahmen, in dem eine Methode verwendet werden soll - zum Beispiel Screening oder Detailuntersuchung - die Auswahl.

Bei Untersuchungen zur Alltagstauglichkeit der POLYBRENE-Methode, die zusätzlich an 100 Kreuzproben und 500 Antikörpersuchtestern ausgeführt wurden, ergab sich eine Rate von 1,3% falsch positiven Ergebnisse im POLYBRENE- gegenüber 0,5% im LISS-Test, während die ALBUMIN-Technik kaum durch unspezifische Reaktionen zu Fehlinterpretationen führte (19).

So eignet sich, da die Inkubationszeiten je nach Arbeitsanfall zwischen 30 und 60 Minuten ohne Nachweisverlust variiert werden können, die ALBUMIN-Technik besonders für große Reihenuntersuchungen ohne Zeitdruck.

Die LISS-Technik mit ihrem relativ guten Zeitvorteil gegenüber dem ALBUMIN und der zumindest gleichwertigen Nachweissicherheit entspricht den Anforderungen für die Routineuntersuchungen an Kreuzprobenplatz am besten.

Die sensitivere POLYBRENE-Technik mit ihrem äußerst geringen Zeitaufwand empfiehlt sich für Notfallsituationen und zur raschen Abklärung von zweifelhaften Ak-Reaktionen.

Faßt man alle Vor- und Nachteile der vorhandenen Methoden zusammen, so kann für die Alltagspraxis eine Kombination von LISS- und POLYBRENE-Technik empfohlen werden:

Mit LISS lassen sich in kurzer Zeit verlässliche Reaktionen ablesen, die (aus forensischen Gründen erforderlich) auch noch einige Zeit nach Abschluß des Tests von einer zweiten Person kontrolliert und gegengezeichnet werden können.

Mit POLYBRENE ist einerseits eine rasche Abklärung von unklaren Befunden sowie andererseits - insbesondere in Akutsituationen - eine Transfusion ohne Verzögerung mit hoher Sicherheit möglich.

5. Zusammenfassung

Wir untersuchten insgesamt 34 Antikörper aus 16 verschiedenen Blutgruppen mit dem Aggregationsvermittler POLYBRENE, einem Fermenttest und je vier LISS- bzw. Albumin-Reagenzien auf die Agglutinationsstärke im quantitativen Drei-Stufen-Agglutinationstest.

In parallelen Ansätzen wurden - wenn möglich - von jedem Patienten antikörperhaltiges Serum und Plasma gegen homo- und heterozygote Testerythrozyten getestet.

Die so zustande gekommenen 798 Verdünnungsreihen bildeten die Grundlage für einen Methodenvergleich.

Bei diesem Vergleich erwies sich der POLYBRENE-Aggregationsverstärker als ein für das gesamte Spektrum untersuchter Antikörper hochsensibles Nachweisreagens. Insbesondere bei Rhesus und Lewis-Antikörpern übertraf die POLYBRENE-Technik die Vergleichsmethoden, während bei KELL-Antikörpern eine relative Nachweischwäche zu verzeichnen war.

Beim Vergleich der modifizierenden Einflüsse von Serum und Plasma ergaben sich lediglich leichte Vorteile bei Verwendung der Serumprobe für den ALBUMIN-Test.

Mit heterozygoten Testzellen konnte bei $\bar{k}$ und $-Jk^a$ kein Nachweis geführt werden. Trotzdem spricht bei einer Reduktion der Reaktionsstärke um lediglich 31% im Durchschnitt der Testzellvergleich nicht gegen eine gleichberechtigte Anwendung beider Indikatortypen.

Die parallel untersuchten LISS- und ALBUMIN-Reagenzien zeigten untereinander kaum Differenzen.

Nach unseren Erfahrungen bereichert der manuelle POLYBRENE -Test als schnelle, AHG-unabhängige Nachweismethode mit sehr hoher Sensitivität und weniger stark entwickelter Spezifität die Möglichkeiten eines Routinelabors, bei Kompatibilitätsprüfungen im Notfall und Eilentscheidungen die Risiken von Bluttransfusionen auf ein Minimum nichtimmunologischer Transfusionsfolgen zu beschränken.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Arndt-Hanser A. (1982): Der Antihumanglobulintest (Coombs test). Sonderheft 3 der BIOTEST-Mitteilungen, 4. Aufl., Mainz
2. Atchley W.A., Bhagavan N.V., Masouredis S.P. (1964): Influence of ionic strength on the reaction between anti-D and D positive red cells. J. Immunol. 93, 701 - 711
3. Begemann H. (1975): Klinische Hämatologie. 2. Aufl., Leipzig, Thieme
4. Bharucha Z.S., Joshi S.R., Bhatia H.M. (1981): Hemolytic disease of the newborn due to anti-Le^b. Vox Sang. 41, 36 - 39
5. Boorman K.E., Dodd B.E. (1964): Blutgruppenserologie. Stuttgart, Fischer
6. Boral L.I., Henry J.B. (1977): The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. Transfusion 17, 163 - 168
7. Busch H. (1978): Grenzen der Massentransfusion. Infusionstherapie 5, 294 - 296
8. Chapman J., Waters A.H. (1981): Haemolytic disease of the newborn due to rhesus anti- $\bar{e}$ antibody. Vox Sang. 41, 45 - 47
9. Clinton B.A., Fruitstone M.J., Rygiel S.A., Moore G.: Immunological identification of cells - erythrocytes. Immunology Research & Development; American Dade Division of American Hospital Supply Corp., Miami, Florida, U.S.A.
10. Cottier H. (1980): Pathogenese. Ein Handbuch für die ärztliche Fortbildung. Berlin - Heidelberg - New York, Springer
11. Diepgen P. (1949): Geschichte der Medizin. I. Band. Berlin, Walter de Gruyter & Co., S. 310
12. Fisher G.A. (1983): Use of the manual Polybrene test in the routine hospital laboratory. Transfusion 23, 151 - 154
13. Freiesleben E., Jensen K.G. (1961): Haemolytic Disease of the newborn caused by anti-M. Vox Sang. 6, 328 - 335

14. Furlong M.B., Monaghan W.P. (1981): Delayed hemolytic episodes due to anti-M. Transfusion 21, 45 - 48
15. Garratty G., Petz L.D. (1971): An evaluation of commercial antiglobulin sera with particular reference to their anticomplement properties. Transfusion 11, 79
16. Geisen H.P., Teinert: Modifiziertes LISS-Reagenz: eine vorteilhafte Variante zu herkömmlichen Verstärker-Reagenzien. Aus den klinischen Laboratorien und der Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg
17. Gill F.J. (1970). Immunochemistry 7, 997 - 1000
18. Hertl M. (1972): Transfusionsmedizin. Stuttgart - New York, Thieme
19. Heim M.U. et al. (1984): Comparison of manual antibody screening techniques with and without using Polybrene^R. In: Abstracts of the 18th Congress of The International Society of Blood Transfusion.
20. Howard J.E., Winn L.C., Gottlieb C.E., Grumet F.C., Garratty G., Petz L.D. (1982): Clinical significance of the anti-complement component of antiglobulin antisera. Transfusion 22, 269 - 272
21. Hughes-Jones N.C., Gardner B., Telford R. (1964): The Effekt of pH and Ionic Strength on the Reaction between Anti-D and Erythrocytes. Immunology 7, 72
22. Humphrey J.H., White R.G. (1971): Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart, Thieme, 236
23. Issitt P.D., Issitt C.H., Wilkinson S.L. (1974): Evaluation of commercial antiglobulin sera over a two-year period. Part I. Anti-Beta 1A, Anti-Alpha 2D and Anti-Beta 1E levels. Transfusion 14, 93 - 102
24. Jungermann K., Möhler H. (1984): Biochemie. Berlin - Heidelberg - New York, Springer

25. Kleihauer E. (ed.) (1978): Hämatologie. Berlin - Heidelberg - New York, Springer, 508
26. Lalezari P., Jiang A.F. (1980): The manual Polybrene test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. Transfusion 20, 206 - 211
27. Lalezari P. (1968): A new method for detection of red cell antibodies. Transfusion 8, 372
28. Landsteiner K. (1900): Zur Kenntnis der anti fermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Zentralbl. Bakteriol. 27, 357 - 362
29. Löw B. & Messeter L. (1974) Antiglobulin test in low ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. Vox Sang. 26, 53 - 61
30. Marsh W.L. (1972): Scoring of hemagglutination reactions. Transfusion 12, 352 - 353
31. Mintz P.D., Haines A.L., Sullivan M.F. (1982): Incompatible crossmatch following nonreactive antibody detection test. Transfusion 22, 107 - 110
32. Molthan L., Strohm P. (1981): Hemolytic transfusion reaction due to Anti-Kell undetectable in low-ionic-strength solutions. Am. J. Clin. Path. 75, 629 - 631
33. Moore H.C., Mollison P.L. (1976): Use of a low-ionic-strength medium in manual tests for antibody detection. Transfusion 16, 291 - 296
34. Moore S.B., Taswell H.F., Pineda A.A., Sonnenberg C.L. (1980): Delayed hemolytic transfusion reactions. Evidence of the need for an improved pretransfusion compatibility test. Am. J. Clin. Path. 74, 94 - 97
35. Müller-Eckhardt C.: Blutgruppenserologie. In: Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik. Behringwerke AG
36. Neppert J., Slowikowski U., Busch H. (1979): Falsch-negativer Antiglobulin-(Coombs-)Test durch antikomplementär wirkende Rinderalbuminchargen bei der Transfusionsvorbereitung. Infusionstherapie 6, Sonderdruck aus Heft 1

37. Oberman H.A., Barnes B.A., Steiner E.A. (1982): Role of the crossmatch in testing for serologic incompatibility. *Transfusion* 22, 12 - 16
38. Petz L.D., Garratty G. (1978): Antiglobulin Sera - Past, Present and Future. *Transfusion* 18, 257 - 266
39. Pollack W., Reckel R.P. (1970): The Zeta-Potential and Hemagglutination with Rh-Antibodies. *Int. Arch. Allergy*. 38, 482
40. Prokop O., Uhlenbruck (1966): *Lehrbuch der menschlichen Blut- und Serumgruppen*. Leipzig, Thieme
41. Rosenfield R.E., Shaikh S.H., Innella F., Kaczera Z., Kochwa S. (1979): Augmentation of Hemagglutination by Low Ionic Conditions. *Transfusion* 19, 499 - 510
42. Schmidt R.F., Thews G. (1977): *Physiologie des Menschen*. Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 342
43. Schönitzer D. (1982): Die Bluttransfusion in der Chirurgie. *Immunologische Grundlagen. Infusionstherapie* 9, 273 - 278
44. Sherwood G.K., Haynes B.F., Rosse W.F. (1976): Hemolytic transfusion reactions caused by failure of commercial antiglobulin reagents to detect complement. *Transfusion* 16, 417 - 420
45. Socha W., Ruffie' J. (1983): *Blood groups of primates*. New York, Alan R. Liss, 31
46. Spielmann W., Kuhn P. (1982): *Blutgruppenkunde*. Stuttgart-New York, Thieme
47. Spielmann W. (1972): *Einführung in die Immunhämatologie und Transfusionskunde*. Weinheim, Verlag Chemie
48. Szymanski I.O., Keegan M. (1982): Mechanism of enhancement of blood group antibody reactions in low ionic strength. *Am. J. Clin. Path.* 78, 360 - 364
49. Szymanski I.O., Keegan M.G., Odgren P.R. (1981): Complement and Ig uptake by erythrocytes in low ionic strength solutions. *Vox Sang.* 41, 151 - 159
50. Vale D.R., Goodhead V.M., Davies P.A., Jenkins M.E. (1981): Red cell antibody screening: a comparative evaluation of four manual techniques. *Med. Lab. Sci.* 38, 379 - 384

7. L E B E N S L A U F

Name:	Klaus Alraun
Geburtsdatum:	17. Januar 1954
Geburtsort:	München
Vater:	Karl Alraun, Rentner, ehem. Maschinenbau- ingenieur
Mutter:	Marianne Alraun, geb. Muschong, Hausfrau
Sept. 1960:	Eintritt in die Volksschule Gerberau
Sept. 1965:	Übertritt in das Gymnasium Dachau
Sept. 1966:	Wechsel an den mathem.-naturwiss. Zweig des Gisela-Gymnasiums München
Mai 1974:	Reifeprüfung am Gisela-Gymnasium
Nov. 1974	Beginn des Studiums der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Mai 1976	Wechsel zum Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 1979:	1. Staatsexamen
Aug. 1981	2. Staatsexamen
Nov. 1982	3. Staatsexamen
Febr. 83	Approbation zum Arzt
Juli 1983	Beginn der Dissertationsarbeit aus der Immunhämatologie im Klinikum Großhadern

Eigene Veröffentlichungen zu diesem Thema:

1. Mempel, W., Heim, M.U., Eckstein, R., Leeping, M., Wegner, J. and Alraun, K. (1984): Red Cell Antibody Screening: A Comparative Evaluation Of Four Manual Techniques.
In: Abstracts of th 18th Congress of the International Society of Blood Transfusion
2. Heim, M.U., Eckstein, R., Leeping, M., Alraun, K., Wegner, J., Klaubert, W., and Mempel, W. (1984): Comparison Of Manual Antibody Screening Techniques With And Without Using Polybrene^R.
In: Abstracts of the 18th Congress of the International Society of Blood Transfusion
3. Heim, M.U., Alraun, K., Eckstein, R., Pachmann, U., Leeping, M., Mempel, W. (1987): Polybrene^R zum Nachweis erythrozytärer Antikörper.
Laboratoriumsmedizin 11, 108-111

